Untersuchungen der Proteine des Weizenklebers mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Franz Knapp
von Tüscherz

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 15. November 1943.

Der Dekan:
Prof. R. Signer.

Graphische Anstalt Schüler A.G. Biel 1944

Untersuchungen der Proteine des Weizenklebers mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung

Inauguraldissertation
der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Franz Knapp
von Tüscherz

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 15. November 1943.

Der Dekan:
Prof. R. Signer.

Graphische Anstalt Schüler A.G. Biel 1944

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde im organisch-chemischen Institut der Universität Bern ausgeführt. Die Anregung zu diesen Untersuchungen gab Herr Prof. Dr. J. Werder, und die Leitung übernahm in freundlicher Weise Herr Prof. Dr. R. Signer.

Leider wurde Herr Prof. Dr. J. Werder bald von einer schweren Krankheit befallen, von der er sich nicht mehr erholen konnte. Im Frühling 1943 hat ihn der ewige Schlaf von seinen Leiden befreit. Nur zu gerne hätte er sich an dem Abschlusse dieser Arbeit erfreut. In stiller Dankbarkeit gedenke ich meines ehemaligen grossen Lehrers.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. R. Signer für das wohlwollende Interesse und die wertvollen Anregungen, mit welchen er diese Arbeit förderte, meinen herzlichen Dank auszusprechen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S .

Seite

I. Einleitung und Problemstellung 6

II. Bisherige Untersuchungsergebnisse über die Zusammensetzung des Klebers 9

1. Die Isolierung des Klebers aus dem Weizenmehl 9

2. Die Extraktionsmethoden 9

3. Die Kleberextraktionsmittel 13

A. Alkohol 13

B. Essigsäure 17

C. Kalilauge 17

D. Harnstoff 17

E. Na-salicylat 18

F. Andere Lösungsmittel 20

4. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Lösungsmittel 22

A. Alkohol 23

B. Essigsäure 25

C. Kali- oder Natronlauge 27

D. Harnstoff 28

E. Na-salicylat 29

5. Die Reinigung der Kleberextrakte 32

6. Fraktionierungen des Klebers und seiner Proteine 35

A. Die Fraktionierung von Gliadin 35

B. Fraktionierungen von dispergiertem Kleber 39

Seite

7. Die Isolierung von Gliadin und Glutenin 43

8. Die Entwicklung der Theorie von Soerensen über die reversibel dissoziabeln Komponentensysteme löslicher Proteine 45

9. Neuere Anschauungen über die Zusammensetzung des Klebers 47

III. Eigene Untersuchungen und ihre Ergebnisse 51

1. Die Isolierung des Klebers aus dem Weizenmehl 51

2. Alkoholische Extraktionen des Klebers 52

3. Die Reinigung der alkoholischen Extrakte 54

4. Die Isolierung von Gliadin 57

5. Denaturierende Wirkungen des Alkohols 60

6. Messungen der Strömungsdoppelbrechung 64

A. Die Darstellung der Lösungen 65

B. Ergebnisse der Messungen 65

7. Kleberextraktionen mit Na-salicylatlösung 75

A. Die Extraktionsmethode 76

8. Die Klärung der Na-salicylat-Kleberextrakte 79

9. Die Ausfällung des gelösten Klebers 80

10. Messungen der Strömungsdoppelbrechung 82

IV. Zusammenfassung 89

Literaturverzeichnis 92

Lebenslauf 94

I. Einleitung und Problemstellung

Die Erforschung der Eiweisskörper hat in den beiden letzten Jahrzehnten sehr bemerkenswerte Fortschritte gemacht. Ständig werden neue Methoden gesucht, die es erlauben sollen, Einblicke in das Wesen der Proteine zu ermöglichen.

Den Proteinindividuen des Weizenklebers wurde seit jeher grosses Interesse gewidmet. Jedoch ist man heute noch weit davon entfernt, dieses Problem als abgeschlossen betrachten zu dürfen.

Der Weizenkleber ist jenes Produkt, das man erhält, wenn vom Weizenmehl die Stärke und Kleie durch Auswaschen mit Wasser abgetrennt werden. Es ist eine zähe, elastische Masse, die hauptsächlich aus Eiweisskörpern besteht. Das Weizenmehl weist durchschnittlich 10-15% dieses Produktes auf. In den Mehlkörperzellen sind die Kleberteilchen in Form der sog. Aleuronkörner zwischen den Stärkekörnern verteilt.

Die ersten umfangreichen Versuche zur Isolierung und Identifizierung der Proteine des Weizenklebers gehen auf Ritthausen (1872) zurück. Gestützt auf die Entdeckungen seiner Vorgänger, und durch eigene Ergebnisse bestärkt, gelangte er zu der Ansicht, dass der Kleber aus vier verschiedenen Proteinen aufgebaut sei. Einen Anteil nannte er "Gluten-Casein". Dies ist eine Fraktion, welche sich we-

der in Wasser, noch in Wasser-Alkohol-Mischungen löst. Den in wässerigem Alkohol löslichen Anteil des Klebers teilte er weiter auf in die drei Eiweisskörper "Mucedin", "Gliadin" und "Gluten-Fibrin".

Demgegenüber vertrat Osborne (1893-1908) die Ansicht, dass der Weizenkleber nur zwei Proteine enthalte. Die Arbeiten von Ritthausen wurden in seinem Laboratorium sehr eingehend geprüft. Seine eigenen Untersuchungsergebnisse auf dem Gebiete der Pflanzenproteine im Allgemeinen und der Kleberzusammensetzung im Speziellen veranlassten ihn zu folgender Kritik:

> "Die Unterschiede der Löslichkeit in verschieden starkem Alkohol und die Abweichungen in der Zusammensetzung, welche Ritthausen die Gegenwart von Mucedin und Gluten-Fibrin vermuten liessen, waren zweifellos verursacht durch die Bildung verschiedener Gliadinsalze mit aus den Samen extrahierten Säuren. Auch Verunreinigungen der Präparate mit nicht eiweissartigen Substanzen können mitgespielt haben".

Osborne teilte den Kleber in zwei Komponenten, auf Grund ihrer Löslichkeit in 70%igem Alkohol. Den löslichen Anteil nannte er "Gliadin", und den unlöslichen "Glutenin". Letzterer ist identisch mit dem Gluten-Casein von Ritthausen. Die von Osborne festgelegte Einteilung des Weizenklebers ist in viele Lehrbücher der organischen Chemie eingegangen, und ist heute noch üblich.

Neuerdings neigen jedoch viele Forscher dazu, den Kleber als einen Proteinkomplex zu bezeichnen. Soerensen

(1930) hat für viele lösliche Proteine eine gut fundierte Theorie aufgestellt. Er ist der Ansicht, dass lösliche Eiweisskörper als reversibel dissoziable Komponentensysteme aufzufassen seien. Er zählt auch den Kleber zu diesen Proteinen. In vielen der jüngst veröffentlichten Arbeiten über die Zusammensetzung des Weizenklebers unterstützen die Verfasser die Auffassung von Soerensen.

In der Schweiz hat als Erster Herr Prof. J. Werder dieses Problem aufgegriffen. Er regte an, dass mit Hilfe der allerneuesten physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden ein tieferes Eindringen in das Wesen des Weizenklebers versucht werden sollte. Da im Institut für organische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. R. Signer mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung auf dem Gebiete der Proteine sehr aufschlussreiche Ergebnisse verzeichnet werden konnten, steht diese Methode im Vordergrunde meiner Untersuchungen.

Meine Aufgabe bestand darin, abzuklären, ob und wie weit mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung die von früheren Forschern isolierten Kleberproteine oder Proteinfraktionen untersucht werden können. Bisher wurden die Viscosimetrie, die Diffusion und die Ultrazentrifuge zu Untersuchungen des gelösten Klebers herangezogen, teilweise mit bemerkenswertem Erfolg. Die Methode der Strömungsdoppelbrechung fand jedoch noch keine Anwendung bei den Kleberproblemen.

II. Bisherige Untersuchungsergebnisse über die Zusammensetzung des Klebers

1. Die Isolierung des Klebers aus dem Weizenmehl.

Die von Ritthausen erstmals beschriebene Methode zur Darstellung des Weizenklebers wurde ohne tiefgreifende Veränderungen von allen Forschern bis heute beibehalten.

Frisches, trockenes Weizenmehl wird mit 70-80% seines Gewichtes Wasser angerührt. Der gut durchgearbeitete Teig bleibt eine halbe Stunde liegen, damit die erforderliche Quellung eintreten kann. Unter einem feinen Strahl kalten Wassers wird die Stärke durch ständiges Kneten von Hand ausgewaschen. Eine vollständige Abtrennung der Stärke konnte jedoch niemals erreicht werden.

Rose & Cook (1935) geben an, dass ihre Kleberauswaschungen 30 min. dauerten. Anschliessend haben sie noch 10 min. mit destilliertem Wasser nachgewaschen.

2. Die Extraktionsmethoden.

Von allen Forschern wird übereinstimmend hervorgehoben, dass der frisch ausgewaschene Kleber sofort der Extraktion unterworfen werden soll. Wird eine vollständige

Trocknung dazwischen geschaltet, so verliert er beträchtlich von seiner Löslichkeit.

Wenn Ritthausen den Kleber mit wässerigem Alkohol extrahierte, so schüttelte er seine Mischungen wiederholt durch. Der Alkohol wurde dabei mehrmals erneuert.

Osborne stellte sein Gliadin entweder durch direkte Extraktion des Weizenmehles her, oder er isolierte zuerst den Kleber durch Auswaschen der Stärke.

Die Mehlextraktion: mit ein und derselben Menge 70%igen Alkohols wurden vier Portionen Weizenmehl nacheinander ausgezogen. Jede Extraktion dauerte 24 std. unter wiederholtem Schütteln. Auf diese Weise erhielt er eine sehr konzentrierte Gliadinlösung. Die verbleibenden Rückstände wurden noch mehrmals mit frischem Alkohol behandelt, bis gar kein Protein mehr in Lösung ging. So erreichte er die vollständige Extraktion des Gliadins.

Die Kleberextraktion: der feinzerteilte Kleber wurde vorerst gewogen. $2/_3$ seines Gewichtes ist Quellungswasser. Daraus wird die erforderliche Menge 92%igen Alkohols berechnet, die zugegeben werden muss, damit die Alkoholkonzentration nachher 70% beträgt. Unter häufigem Umrühren, oder noch besser durch Auskneten von Hand, wurde während 24 std. digeriert. Die Lösung wurde durch Abpressen zurückgewonnen, und der Rückstand noch mehrmals mit 70%-igem Alkohol ausgezogen.

Blish & Sandstedt (1929) verwendeten auf je 2 gr Kleber 200ccm 70%igen Alkohols. Ihre Extraktionen dauerten

3 std. unter kräftigem Schütteln bei Raumtemperatur. Die klarfiltrierten Lösungen enthielten 52,8% des total im Kleber vorhandenen Proteins.

Diese Methode ist offenbar am vorteilhaftesten, wenn mit wässerigem Alkohol eine möglichst hohe Gliadinausbeute erreicht werden soll.

Troensegaard (1931) ging nach einer ähnlichen Methode vor wie Osborne. Zunächst bestimmte er den Wassergehalt des Feuchtklebers, der meistens 67% betrug. Dann zerkleinerte er den Kleberklumpen mit einer in jeder Haushaltung gebräuchlichen Fleichhackmaschine. Hierauf fügte er so viel 92%igen Alkohols hinzu, bis dessen Konzentration 58gew%ig war. In verschlossenen Flaschen wurde diese Lösung mehrere Tage bei 25-35° beiseite gestellt. Hie und da wurde gut durchgeschüttelt. Dann wurde der Auszug abgegossen, und die Extraktion mit 58gew%igem Alkohol zweimal wiederholt.

Die folgenden Zahlen zeigen, wieviel Gliadin die verschiedenen Forscher mit wässerigem Alkohol extrahieren konnten:

Ritthausen	26-28%	des	wasserfreien	Klebers
Troensegaard	15-17%	"	"	"
Blish & Sandstedt	52%	"	"	"

Von Osborne liegt nur die Behauptung vor, dass der Kleber etwa 40-50% Gliadin enthalte.

Besondere Ansätze und Methoden wurden berücksichtigt, wenn der Kleber mit Na-salicylatlösungen verschiede-

ner Konzentration extrahiert wurde. Na-salicylat ist jenes Lösungsmittel, welches in letzter Zeit am meisten verwendet wurde, weil es die Originaleigenschaften der Kleberproteine am besten konservierte.

Cook & Rose (1934) verwendeten auf 5 gr Mehl, oder den daraus ausgewaschenen Kleber, 100ccm einer 10-12%igen Na-salicylatlösung. Unter kräftigem Schütteln dauerte die Extraktion 6 std. Auf diese Weise liess sich der Kleber praktisch vollständig dispergieren.

Die Verfasser haben nachweisen können, dass grössere Lösungsmittelmengen oder Verlängerung der Extraktionsdauer von geringem Einfluss waren auf die dispergierte Klebermenge.

Nach der gleichen Methode gingen später auch Mc Calla & Rose (1935), Spencer & Mc Calla (1938) sowie Mc Calla & Nils Gralén (1940) vor. Meistens verwendeten diese Forscher bei ihren Extraktionen so viel Kleber, dass 1ccm der erhaltenen Lösung 5 mgr N enthielt. Da die Proteine durchschnittlich 17,5% N aufweisen, entsprechen diese 5 mgr N einer Proteinmenge von 28,5 mgr pro 1ccm.

Spencer & Mc Calla prüften die Frage, wie manche Extraktion derselben Kleberportion ausgeführt werden muss, um eine vollständige Dispersion zu erreichen. Als Lösungsmittel verwendeten sie reines Wasser und Na-salicylatlösungen verschiedener Konzentration. In den aufeinanderfolgenden Extrakten bestimmten sie den N-gehalt. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über ihre Ergebnisse.

	reines H_2O	2%ige	5%ige	8%ige Salicylatlösung
1.Extrakt	5,7%	38,5%	70,1%	96,5% N
2. "	3,5%	6,8%	4,2%	0,8% N
3. "	2,0%	2,6%	1,2%	0,2% N
4. "	1,8%	1,7%	0,6%	0,0% N

Vorerst zeigt sich, dass die dispergierte Klebermenge mit der Salzkonzentration des Lösungsmittels zunimmt. Ferner enthalten die ersten Extrakte immer am meisten Protein-N. Bei einer 8%igen Na-salicylatlösung genügt eine einzige Extraktion, um den Kleber praktisch vollständig zu dispergieren.

3. Die Kleberextraktionsmittel.

A. Alkohol.

Ritthausen verwendete bei seinen Kleberextraktionen 60-85%igen Aethylalkohol.

Osborne fand bei seinen Versuchen, dass 70%iger Aethylalkohol die besten Gliadinausbeuten lieferte. Wenn er die Alkoholkonzentration steigerte oder verringerte, so enthielten die Extrakte weniger Gliadin.

Schleimer (1914) beschäftigte sich ebenfalls mit der Löslichkeit von Gliadin in Alkohol verschiedener Konzentration. Er konnte nachweisen, dass dieser Eiweisskörper nicht in 70vol%igem, sondern in 55vol%igem Aethylalkohol am besten löslich sei. Bei dieser Gelegenheit schloss er in seine Versuche auch Methyl- und Propyl-alkohol ein.

In 60vol%igem Methylalkohol, sowie in 40vol%igem Propylalkohol fand er die Löslichkeitsmaxima für Gliadin.

Diese Angaben wurden später von Dill & Alsberg (1925) annähernd bestätigt, wie aus dem folgenden Abschnitt ersichtlich ist.

Ganz besonders eingehend prüften Dill & Alsberg (1925) die Löslichkeit von gereinigtem Gliadin in wässerigem Aethylalkohol verschiedener Konzentration. Von dieser interessanten Arbeit wird hier noch mehrmals die Rede sein. Ueberraschenderweise sind diese Ergebnisse von späteren Forschern wenig berücksichtigt worden, während andere Veröffentlichungen von Dill & Alsberg mehr Beachtung fanden.

Die Löslichkeit von Gliadin in Alkohol-Wasser-Mischungen wurde nach einer ganz besonderen Methode bestimmt. Das Ausgangsmaterial war bei der Isolierung so gut gereinigt worden, dass es sich in dem verwendeten Lösungsmittel wasserklar auflöste. Diese Lösungen wiesen auch nach einem Monat weder eine Trübung, noch eine Opaleszenz auf. Das gelöste Protein veränderte sich in der äusseren Erscheinung gar nicht!

Von diesem reinen Gliadin wurden verschieden konzentrierte Lösungen in 50-70%igem Aethylalkohol durch Erwärmen auf 50° hergestellt. Durch langsames Abkühlen (3-4° pro std.) wurde das Gliadin bei einer bestimmten Temperatur teilweise ausgefällt, erkennbar an der auftretenden Trübung. Diese Trübungspunkte finden sich in der

folgenden Tabelle:

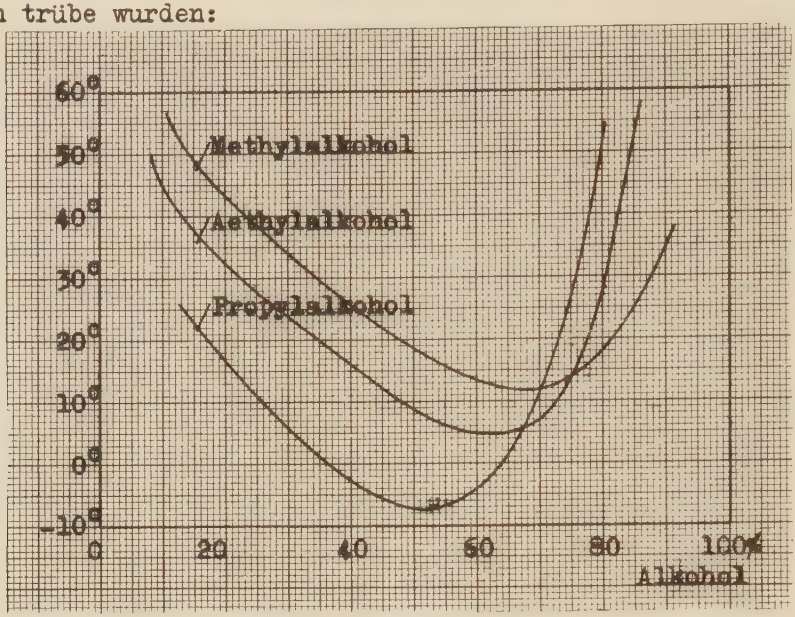
Gliadinkonz. in %	Alkoholkonzentration in Vol% 50%	60%	70%
0,10	-3^{o}	-2^{o}	-2^{o}
0,20		-1^{o}	0^{o}
0,40	$+5^{o}$	-1^{o}	$+3^{o}$
0,80	$+6^{o}$	-1^{o}	
1,00		$+1^{o}$	$+3^{o}$
2,50	$+7^{o}$	$+2^{o}$	$+6^{o}$
10,00		$+1^{o}$	$+8^{o}$
25,00	$+8^{o}$	$+2^{o}$	$+8^{o}$

Es zeigte sich, dass bei den Lösungen mit 2,5-25% Gliadingehalt die Temperatur der beginnenden Trübung fast unveränderlich blieb. Das bedeutet, dass die Löslichkeit dieses Kleberproteins in diesem Konzentrationsintervall ziemlich konstant ist. Dies trifft auch bei verschiedener Alkoholkonzentration zu. Bei verdünnteren Gliadinlösungen liegt der Trübungsbeginn etwas tiefer, und schwankt innerhalb einiger Grade.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass diese Forscher 25%ige Gliadinlösungen herstellen konnten, die bei Raumtemperatur wasserklar waren. Es ist ihnen sogar gelungen, eine 50%ige Gliadinlösung in 50%igem Alkohol herzustellen, aber diese war so viskös, dass sie sich zu Versuchen nicht mehr eignete.

Die Messungen der Gliadinlöslichkeit wurden auch über den ganzen Konzentrationsbereich von 10-90%igem Alkohol ausgedehnt. Ferner gelangten in derselben Weise Methyl- und n-Propyl-alkohol zur Verwendung. Die Lösungen mit kleinem Alkoholgehalt mussten allerdings auf 70^{o} erwärmt werden.

Nur dann löste sich das Gliadin klar auf. Das folgende Diagramm gibt Aufschluss, bei welchen Temperaturen die Lösungen trübe wurden:



Oberhalb der Kurven sind die Lösungen wasserklar, und unterhalb bestehen zwei Phasen. Die sich daraus ergebenden Löslichkeitsmaxima von Gliadin in den drei Alkoholen sind:

in 68,5%igem Methylalkohol
in 63,0%igem Aethylalkohol
in 51,0%igem Propylalkohol.

Der Physico-Chemiker Martin (1931) fand seinerseits bei Messungen des Strömungspotentials, dass die Löslichkeit von Gliadin in 57vol%igem Aethylalkohol am grössten war. Auch dieses Ergebnis deutet also an, dass die Verwendung von 70%igem Alkohol überholt ist. Empfehlenswerter ist demnach 60%iger Aethylalkohol, wenn es sich darum handelt, möglichst viel Gliadin aus dem Kleber heraus zu lösen.

B. Essigsäure.

Schon Ritthausen verwendete stark verdünnte Essigsäure, und konnte darin den Kleber vollständig lösen.

Osborne bestätigte, dass Glutenin und Gliadin in verdünnter Essigsäure gut löslich sind.

Bei Blish & Sandstedt (1933) finden sich nähere Angaben, dass sie den Kleber in 0,05n Essigsäure auflösten.

Cook & Rose (1934) dispergierten den Kleber für ihre Viscositätsmessungen in 0,1n Essigsäure.

C. Kalilauge.

Ritthausen gab den alkalischen Kleberdispersionen den Vorzug gegenüber den essigsauren Lösungen. In ersterem Lösungsmittel vollzog sich die Auflösung viel rascher, und die abzutrennenden Verunreinigungen (Stärke und Kleie) setzten sich besser zu Boden.

Dieses Lösungsmittel stellte er sich her durch Auflösen von 2 gr KOH pro 1 lt Wasser. Um 200-250 gr Feuchtkleber aufzulösen, musste er 1 lt Kaliwasser aufwenden.

D. Harnstoff.

Cook & Alsberg (1931) stellten fest, dass der Kleber in 30%iger Harnstofflösung eine viel bessere Einheit-

lichkeit aufwies, als in den bisher verwendeten Lösungsmitteln. Auch Glutenin und Gliadin wiesen keine Unterschiede in der Löslichkeit in diesem neuen Lösungsmittel auf.

Durch systematische Versuche gelangten Cook & Rose (1934) zu der Erkenntnis, dass sich der Kleber am weitgehendsten löst in 24%iger Harnstofflösung.

Sie extrahierten den Kleber mit verschieden konzentrierten Harnstofflösungen, und bestimmten den N-gehalt der Extrakte. Hierfür musste eine ganz besondere Methode eingehalten werden, weil ja das Lösungsmittel von sich aus sehr N-reich ist. Schliesslich erhielten sie folgende Resultate:

Harnstoff-konz. in %	extrahierter Kleber-N in %
18,0	85,4
21,0	94,6
24,0	99,7
27,0	99,5

24- und 30%ige Harnstofflösungen wurden später von vielen Forschern bei ihren Untersuchungen verwendet.

E. Na-salicylat.

Cook & Rose (1934) dehnten ihre mit Harnstoffextrakten gemachten Untersuchungen auch auf Na-salicylatextrakte aus. Sie dispergierten 5 gr Mehl, oder den daraus ausgewaschenen Kleber, in 100ccm Na-salicylatlösung von bestimmter Konzentration. In den filtrierten Extrakten ermittelten sie

dann den N-gehalt:

Na-salicylat-konz. in %	extrahierter Kleber-N in %
7,0	92,0
8,0	99,2
9,0	99,3
10,0	99,1
12,0	99,9

In 10-12%iger Na-salicylatlösung liess sich der Kleber am schnellsten und vollständigsten dispergieren. Wurden noch konzentriertere Salicylatlösungen verwendet, so ging der Kleber nicht mehr so gut in Lösung.

Eine sehr wertvolle Ergänzung der obigen Resultate bilden die Versuche von Mc Calla & Nils Gralén (1940). Sie dispergierten den Weizenkleber nach der auf Seite 12 beschriebenen Methode. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge konnten sie dann den Prozentsatz an molekular gelöstem Kleberprotein in verschieden konzentrierten Na-salicylatlösungen ermitteln:

Na-salicylat-konz. in %	molekular gelöstes Klebereiweiss in %
2,0	14
4,0	34
6,0	48
8,0	68
10,0	72
12,0	84
16,0	77

Die schon früher von Mc Calla & Rose (1935) auf chemischem Wege ermittelten Ergebnisse: das Dispersionsvermögen von Na-salicylatlösungen nehme proportional mit der Salzkonzen-

tration bis zu 8% hinauf zu, liessen sich nun sehr schön mit der Ultrazentrifuge bestätigen. Weniger erfreulich ist dagegen, dass in Na-salicylatlösung maximal 84% des Klebers wirklich molekular gelöst werden können.

Wie aus den folgenden Abschnitten zu ersehen ist, werden bei den neuesten Kleberuntersuchungen vornehmlich Na-salicylatlösungen als Dispersionsmittel verwendet. Seine guten Eigenschaften liessen sich bisher von keinem der untersuchten Lösungsmittel überbieten.

F. Andere Lösungsmittel.

An Vorschlägen für weitere Lösungsmittel fehlt es in der Literatur nicht. Ihre Vor- und Nachteile sind aber teilweise noch so wenig erforscht, dass sie vorläufig keine Anwendung fanden. Einige sollen trotzdem hier aufgeführt werden.

Dill & Alsberg (1925) prüften insbesondere die Löslichkeit von Gliadin in verschiedenen Salzlösungen. Sie bestimmten für jedes Salz die in Wasser minimal erforderliche Konzentration, damit das Gliadin bei 20° in Lösung bleibt:

Salz	minimale molare Konz.
Kaliumthiocyanat	1,06
Ammoniumthiocyanat	1,09
Kaliumjodid	5,0
Harnstoff	2,03

Als weitere Lösungsmittel, in denen das Gliadin ebenfalls wasserklar in Lösung geht, geben diese Forscher an:

Glycerin
Aethylenglykol
Propylenglykol,

ferner obige Medien auch mit Wasser mehr oder weniger verdünnt. Weiter werden genannt: absoluter Alkohol mit einem Ueberschuss an Glycerin, und Wasser mit 10-25% Methyl-äthyl-keton.

Von anderen Forschern wurde wiederholt eine Mischung von Aethylalkohol und Essigsäure als Lösungsmittel für den Kleber verwendet.

Sandstedt & Blish (1933) lösten den Feuchtkleber zuerst in 0,01-0,05n Essigsäure, und fügten dieser Lösung so viel Alkohol zu, bis dessen Konzentration 55vol%ig war.

Auch Bailey & Harris (1937) machten von diesem Medium mit gutem Erfolg Gebrauch. Diese Forscher, sowie Stockelbach & Bailey (1938) verwendeten jedoch 0,1n Essigsäure. Dann gaben sie so viel 95%igen Alkohol dazu, bis dessen Konzentration 50vol%ig war.

Die beiden russischen Forscher Kniaginicev & Gerolkina (1938) wiesen wieder auf neue Lösungsmittel hin:

10%ige wässerige Na-salicylatlösung (schon bekannt)
10%ige wässerige Na-benzoatlösung
10%ige Na-salicylatlösung in 50%igem Alkohol
10%ige Na-benzoatlösung in 50%igem Alkohol
Glycerin von der Dichte 1,23.

In diesen Medien soll sich der Weizenkleber vollständig

gelöst haben. Nach der Ausfällung sollen alle natürlichen Eigenschaften des ursprünglichen Klebers immer noch vorhanden gewesen sein.

Krejci & The Svedberg (1935) extrahierten den Kleber mit 0,5n Lösungen von KJ, KBr und KCl. In der Ultrazentrifuge konnten sie feststellen, dass diese Lösungsmittel in der aufgeführten Reihenfolge Proteingemische von abnehmendem durchschnittlichem Molekulargewicht extrahierten. Der Aggregationszustand war also abhängig von dem verwendeten Lösungsmittel.

4. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Lösungsmittel.

Schon Osborne erkannte, dass die pflanzlichen Proteine bei ihrer Isolierung weitgehende Veränderungen, besonders der Löslichkeit, erleiden können. Geringfügige Unterschiede im Gehalt an gebundener Säure haben oft derartige Folgen, dass der Untersuchende leicht zu Trugschlüssen verleitet wird. Ein Präparat, das in Wirklichkeit nur ein Protein enthält, wurde oft als ein Gemisch von zwei oder mehreren Proteinen angesprochen.

Wenn die Proteine nicht aus chemisch neutralen Lösungen isoliert werden, sind sie je nach den Fällungsbedingungen mit geringen Mengen Säure oder Base verbunden. Nicht zu vernachlässigen sind die durch Samenfermente verursachten Veränderungen.

A. Alkohol.

Die einzigen Forscher, welche erkannt haben, dass Gliadin in wässerigem Alkohol irreversible Veränderungen erleidet, waren Dill & Alsberg (1925). Sie beschäftigten sich eingehend mit dieser Erscheinung, konnten jedoch keine befriedigende Erklärung dafür finden.

Sie extrahierten den Kleber mit wässerigem Alkohol nach derselben Methode wie Osborne (siehe Seite 10). Die Aufarbeitung des Gliadins aus den Extrakten vollzogen sie nach einer eigenen Methode, die in einem der folgenden Abschnitte beschrieben wird.

Nach dieser Methode konnten sie ein Kleberprotein isolieren, das in wässerigem Aethylalkohol wasserklar gelöst werden konnte. Solche Lösungen blieben auch während einem Monat vollständig klar.

Demgegenüber erhielten die Verfasser einige Gliadinpräparate, die schon von Anfang an trübe Lösungen ergaben. Sie erkannten den Grund für diese Erscheinung darin, dass diese Präparate bei der Aufarbeitung zu wenig entwässert worden sind. Das für die Entwässerung des Proteins erforderliche Volumen absoluten Alkohols wurde bei diesen Gliadinen zu klein bemessen.

Diese Präparate wurden anschliessend in 70%igem Alkohol gelöst, und nachher nach der üblichen Methode von Dill & Alsberg aufgearbeitet. Es zeigte sich, dass bei jedem Präparat die Hälfte des Gliadins als unverändertes Produkt zurückgewonnen werden konnte.

Weitere Versuche gaben zu erkennen, dass das Gliadin in Berührung mit 75-85%igem Alkohol irreversibel verändert wurde. Es war jedoch schwierig, diese Veränderungen zu reproduzieren. Der Wassergehalt des Gliadins und die herrschende Temperatur sind nach der Ansicht der Verfasser die wichtigsten Variabeln. Auch in 70%igem Alkohol traten unter gewissen Bedingungen solche Veränderungen ein.

Dieses denaturierte Gliadin liess sich in keiner Alkoholkonzentration, auch nicht in heissem Alkohol, auflösen.

Dill & Alsberg schreiben, dass diese Denaturierung des Gliadins recht bedeutend sei, und bereits bei der Extraktion des Klebers eintrete. Bei ihrer Darstellungsmethode bleibt jedoch der denaturierte Anteil des Proteins im Kleber, oder er scheidet sich mit der Stärke ab.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhange, dass die Denaturierung des Gliadins nur bei der Isolierung eingetreten ist, während andere alkoholische Lösungen einen ganzen Monat unverändert haltbar waren!

Es lässt sich also gut erklären, dass die meisten Forscher, welche Glutenin aus dem Kleber darstellten und analysierten, ganz unterschiedliche Resultate erhielten. Das denaturierte Gliadin ist nämlich in Kaliwasser ebenso gut löslich wie das Glutenin.

Dill & Alsberg verwendeten auch 10 und 20%igen Propylalkohol zu Kleberextraktionen. Bei 30-40^{o} konnten sie beträchtliche Mengen Gliadin herauslösen. Dabei traten gar keine irreversiblen Veränderungen an dem Protein ein.

Schon Ritthausen, und später noch viele andere Forscher konnten feststellen, dass heisser Alkohol bedeutend mehr Gliadin extrahierte, als dies bei Raumtemperatur der Fall ist. Viele vermuteten, dass der Mehrbetrag von dispergiertem Glutenin herrühre. Der nach der Extraktion verbleibende Rückstand konnte in den sonst brauchbaren Lösungsmitteln Kaliwasser und verdünnter Essigsäure nicht mehr gelöst werden. Hier trat also auch eine Denaturierung des alkoholunlöslichen Glutenins ein.

Sandstedt & Blish (1933), welche sich sehr eingehend mit den Vor- und Nachteilen verschiedener Lösungsmittel beschäftigten, lehnten den Alkohol aus folgenden Gründen ab:

Bei alkoholischen Kleberextraktionen ist die Gliadinausbeute sehr schwankend. Sie ist abhängig von der Alkoholkonzentration, der Temperatur, dem Verhältnis zwischen Lösungsmittelmenge und Kleber, der Extraktionsdauer und der Anzahl aufeinanderfolgender Extraktionen. Das Gliadin konnte nie vollständig abgetrennt werden.

B. Essigsäure.

Sandstedt & Blish (1933) beschäftigten sich jahrelang mit Untersuchungen über die Löslichkeit des Klebers. In verdünnter Essigsäure dispergierte Kleberproteine erlitten nicht merkliche physikalische oder chemische Veränderungen. Allerdings konnten diese Dispersionen weder

durch Filtrieren noch durch Zentrifugieren von der Stärke befreit werden. Die Teilchengrösse variierte innerhalb eines grösseren Bereiches. Daher verstopften die grösseren Kleberteilchen von gelatineartigem Charakter immer die Filterporen.

Cook & Rose (1934) prüften die Beständigkeit von essigsauren Kleberlösungen viscosimetrisch. Sie liessen diese Lösungen acht Tage bei 25° stehen, und massen periodisch ihre Viscosität.

Vorerst zeigte sich, dass die Viscosität fast linear mit der Proteinkonzentration zunimmt. Alle Lösungen wiesen innert acht Tagen eine beträchtliche Viscositätsabnahme auf. Die Verfasser erklären diesen Abfall dadurch, dass der Kleber ausserordentlich langsam in der Essigsäure dispergiert wird. Auch nach acht Tagen hatte sich noch kein stabiles Gleichgewicht eingestellt.

In einer andern Versuchsreihe untersuchten die Verfasser die hydrolysierende Wirkung der Essigsäure. Sie setzten essigsaure Kleberdispersionen verschiedenen Temperaturen aus. Anschliessend wurden die Proteine entweder mit Tanninsäure oder mit Trichloressigsäure ausgefällt. In den Filtraten wurde der N-gehalt bestimmt, der von hydrolysiertem Protein herrührte. Es zeigte sich hierbei, dass die Essigsäure sogar bei 0° hydrolysierend wirkte. Eine während 36 Tagen bei 0° aufbewahrte Lösung wies in ihrem Filtrat 11,2% des im Kleber vorhandenen Stickstoffes auf.

Die Essigsäure ist also ein ungeeignetes Kleberlösungsmittel.

C. Kali- oder Natronlauge.

Sandstedt & Blish (1933) heben hervor, dass verdünnte Alkalien eine vollständige Dispersion der Kleberproteine bewirken. Dieser Vorgang vollzieht sich innert kürzester Zeit. Die erhaltenen Lösungen lassen sich ohne irgendwelche Proteinverluste wasserklar filtrieren.

Jedoch unterliegen die Proteine immer einer irreversiblen Alterung. Diese äussert sich darin, dass die wieder ausgefällten Eiweisskörper ihre ursprüngliche Elastizität vollständig verloren haben. Diese Veränderung hängt nachweislich von der Alkalikonzentration, der Einwirkungszeit und der Temperatur ab. Die Verfasser vermuteten, dass diese Denaturierung auf hydrolytische Wirkungen zurückzuführen sei.

Dass Sandstedt & Blish mit ihrer Vermutung auf dem richtigen Wege waren, bewiesen Cook & Rose (1935). Die alkalische Lösung wirkte bei 0^{o} noch stärker hydrolysierend als die Essigsäure derselben Konzentration. Nach 21 Tagen konnten die Verfasser in dem Filtrat der ausgefällten Proteine 17,1% Stickstoff nachweisen.

Bei ihren Viscositätsmessungen mit alkalischen Kleberlösungen zeigte sich nur in den ersten vier Tagen ein deutlicher Viscositätsabfall. Bis zum achten Tage trat keine Veränderung mehr ein. Dieses Verhalten deutet an, dass sich der Kleber in verdünnten Alkalien schneller löst als in Essigsäure.

Alkalische Medien sind als Kleberlösungsmittel auch

nicht zu empfehlen, weil sie irreversible und abbauende Veränderungen der Proteine bewirken.

D. Harnstoff.

Das Verhalten des Klebers in 30%iger Harnstofflösung ist ganz eigenartig. Rose & Cook (1934) haben die Viscosität von mehr oder weniger konzentrierten Kleberlösungen während mehreren Tagen verfolgt.

Eine 10,7% Kleber-N enthaltende Lösung in 30%igem Harnstoff wies am ersten Tage eine Viscositätsabnahme auf. Dann stieg die Viscosität bis zum vierten Tage wieder an. Demgegenüber verhielt sich eine Lösung, die 5,24% Kleber-N enthielt, ganz anders. Zuerst sank die Viscosität ebenfalls. Dann blieb sie aber sieben Tage konstant.

Die Verfasser sind der Ansicht, dass das Verhalten der konzentrierteren Lösung so erklärt werden muss: der eintretende Viscositätsabfall wird hervorgerufen durch die sich vollziehende Dispersion des Klebers; diesem Vorgange folgt offenbar eine Art Aggregation oder Ausflockung der Kleberteilchen.

Diese Erscheinung konnte bei verdünnteren Kleberlösungen nie beobachtet werden. Auch konzentrierte Lösungen in Alkali oder Essigsäure wiesen diesen Effekt nicht auf.

Bei Untersuchungen der hydrolysierenden Wirkung von 30%iger Harnstofflösung konnten Rose & Cook keine Proteinspaltung nachweisen. Sie haben ihre Lösungen teilweise drei Stunden auf 80° erwärmt, und anschliessend 30 Tage bei 25°

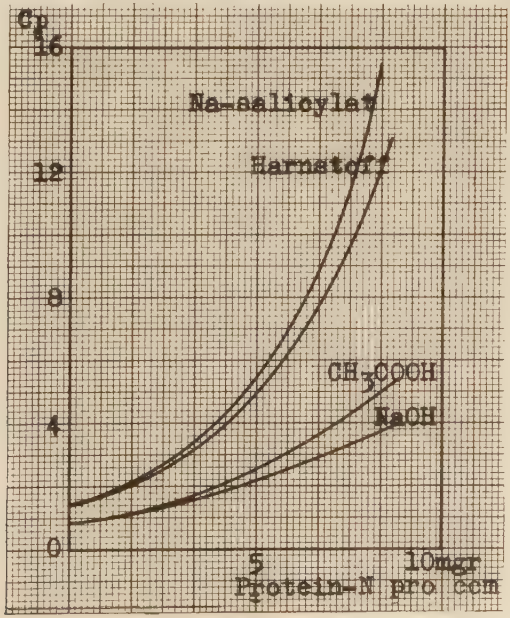
stehen lassen.

Harnstofflösungen eignen sich also gut für die Dispersion von Weizenkleber. Die Kleberkonzentration darf jedoch nicht zu gross sein. Einen Nachteil weist dieses Lösungsmittel trotzdem auf. Da es selber N-haltig ist, müssen recht umständliche Vorkehren getroffen werden, wenn der darin dispergierte Protein-N quantitativ bestimmt werden soll.

E. Na-salicylat.

Cook & Rose ($1934/_{35}$) dehnten ihre Untersuchungen über die Beständigkeit von Kleberdispersionen auch auf Na-salicylatlösungen aus.

Die Viscosität des Klebers in 12%iger Na-salicylatlösung ist bedeutend grösser als in den bisher besprochenen Lösungsmitteln. Ferner nimmt sie mit der Kleberkonzentration am stärksten zu. Die folgenden Kurven geben hierüber Aufschluss.



Wurden verschieden konzentrierte Kleberlösungen in 12%igem Na-salicylat acht Tage bei 25° stehen gelassen, so fielen die Viscositätsmessungen wieder anders aus als bei den Harnstofflösungen. Eine 10,0% Kleber-N enthaltende Lösung wies gar keinen Viscositätsabfall auf. Ihre Viscosität nahm während acht Tagen kontinuierlich zu. Es stellte sich kein Gleichgewicht ein. Die Lösung, welche dagegen nur 5% Kleber-N enthielt, wies während acht Tagen gar keine Schwankungen der Viscosität auf.

Die Verfasser prüften die Beständigkeit der Kleberproteine in Na-salicylatlösung auch auf eine andere Weise. Sie liessen eine 5mgr Kleber-N enthaltende Lösung während 30 Tagen bei 25° stehen. Dann wurde das Protein durch Zugabe gesättigter $MgSO_4$-Lösung wieder ausgefällt. Der entstehende Niederschlag setzte sich zu Boden, ohne dass zentrifugiert werden musste. Das erhaltene Produkt war weich und zähe, aber unelastisch.

Dieselben Versuche wurden auch mit den andern bisher beschriebenen Lösungsmitteln durchgeführt. Nirgends konnte ein Produkt ausgefällt werden, das dem ursprünglichen Kleber so ähnlich war, wie dasjenige aus der Na-salicylatlösung.

In einer weiteren Versuchsreihe konnten Cook & Rose nachweisen, dass 12%ige Na-salicylatlösung auch durch drastische Hitzebehandlung nur eine zu vernachlässigende Menge Kleberprotein hydrolysierte.

Sandstedt & Blish (1933) stellten an das ideale Kleberlösungsmittel die Anforderungen:

a. es muss alle Kleberproteine vollständig dispergieren,

b. die Dispersionen müssen ohne Proteinverluste filtrierbar sein,

c. das gelöste Protein soll wieder vollständig als Ganzes, oder in Fraktionen zurückgewonnen werden können,

d. die Originaleigenschaften des Klebers dürfen weder in der Lösung noch beim Ausfällen verloren gehen.

Na-salicylat erfüllt diese Anforderungen als Lösungsmittel bisher am weitgehendsten. Es weist aber immer noch einige Nachteile auf:

a'. wie Mc Calla & Nils Gralén mit Hilfe der Ultrazentrifuge nachgewiesen haben, lassen sich unter den günstigsten Bedingungen maximal 84% der Kleberproteine wirklich molekular auflösen;

b'. Blish (1936) hat gezeigt, dass Na-salicylatlösungen auch etwas Stärke dispergieren. Rose & Cook (1934) berichten, dass sich die Stärke mit Hilfe einer Sharples-Superzentrifuge (40000 Umdrehungen pro min.) nicht ohne geringe Proteinverluste abtrennen liess.

Mc Calla & Nils Gralén weisen darauf hin, dass auch vollständig stärkefreie Kleberdispersionen in Na-salicylat ganz undurchsichtig sind. Erst bei 65000 U.p.m. wurden sie klar.

c'.Mc Calla & Rose (1935) haben in einer Reihe von Experimenten nachweisen können, dass die dispergierten Kleberproteine durch Zugabe von $MgSO_4$-Lösung nicht mehr vollständig ausgefällt werden können. Ein gewisser Anteil von 10-15% weist eine zu grosse Löslichkeit auf.

d'.Mehrere Forscher haben versucht, den dispergierten Kleber wieder irgendwie auszufällen, aber bisher isolierte keiner ein Produkt, dessen Eigenschaften in jeder Beziehung denjenigen des ursprünglichen Klebers entsprochen hätten.

Diese Ergebnisse zeigen ganz deutlich, dass auch Na-salicylatlösungen als Lösungsmittel unbefriedigende Eigenschaften aufweisen. Bisher konnte allerdings noch kein besseres Kleberlösungsmittel gefunden werden. Man ist also noch recht weit entfernt von jenem idealen Lösungsmittel für den Weizenkleber, welches Sandstedt & Blish forderten.

5. Die Reinigung der Kleberextrakte.

Die trüben alkoholischen Kleberextrakte klärten viele Forscher durch Filtration. Osborne bereitete auf einer Nutsche einen dicken Filzfilter aus Papierpulpe vor. Mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe liess er diese Schicht zusammenbacken, und tränkte sie anschliessend mit der reinen Extraktionsflüssigkeit.

Diese Methode eignete sich allerdings nur für klei-

ne Flüssigkeitsmengen. Die filtrierende Schicht musste sehr oft erneuert werden. Trotzdem hatte Osborne Mühe mit der Abtrennung der Stärke.

Dill & Alsberg (1925), welche grossen Wert darauf legten, besonders reines Gliadin darzustellen, umgingen eine mühsame Filtration ihrer Lösungen.

Die alkoholischen Kleberextrakte wurden zuerst unter vermindertem Drucke bei 50° zu einem dicken Sirup eingeengt. Diesen gossen sie in das fünffache Volumen einer 1%igen NaCl-Lösung. Durch kräftiges Schütteln schied sich das Protein als Schaum ab. Die Flüssigkeit liess sich leicht abgiessen. Hierauf wurde noch dreimal mit je 1 lt NaCl-Lösung ausgewaschen.

Dem nassen Proteinschaum wurde so viel 95%igen Alkohols zugefügt, bis dessen Konzentration 70%ig war. Diese Lösung wurde während 24 std. bei +5° aufbewahrt. Hierbei schied sich ziemlich viel Gliadin honigartig ab. Gleichzeitig setzten sich die Lipoide und suspendierten Verunreinigungen grösstenteils zu Boden, welche durch Filtration kaum abgetrennt werden konnten.

Die nachher abdekantierte Flüssigkeit war immer noch trübe, klärte sich aber vollständig bei Raumtemperatur. Der honigartige Bodenkörper wurde mit warmem 70%igem Alkohol ausgezogen, und die Lösung nochmals in der eben beschriebenen Weise behandelt.

Diese Methode liess sich allerdings nur unter Verlust von etwas Gliadin durchführen. Die Präparate waren je-

doch viel reiner als jene, welche durch Filtration gereinigt wurden.

Troensegaard (1931) klärte seine alkoholischen Kleberlösungen nach einer ganz ähnlichen Methode. Er liess die Extrakte während mehreren Tagen bei 8-12° in verschlossenen Flaschen stehen. Dabei bildete sich ein Bodenbelag von Stärke, auf den sich eine Schicht von unreinem Gliadin absetzte. Wenn zu viel Gliadin ausgefallen war, wurde es wieder in 58gew%igem Alkohol aufgenommen und neuerdings stehen gelassen. Schliesslich filtrierte er die Lösungen durch ein wiederholt erneuertes Faltenfilter.

Diese beiden Reinigungsmethoden von Dill & Alsberg und von Troensegaard ergaben die reinsten Gliadinpräparate. Von andern Forschern wurde nie versucht, die trüben Extrakte mit Hilfe der Sharples-Superzentrifuge oder der Ultrazentrifuge zu klären. Selbst The Svedberg trennte die Verunreinigungen durch Stehenlassen der Extrakte im Eisschrank ab.

Bei der Klärung der Kleberdispersionen in Na-salicylatlösung wurden jedoch andere Wege eingeschlagen. Wie bereits erwähnt, konnte Blish (1936) mit Hilfe der Sharples-Superzentrifuge die Stärke vollständig aus den Salicylatlösungen abscheiden. Dabei trat jedoch ein Proteinverlust von 10-12% ein.

Mc Calla & Nils Gralén berichten, dass auch stärkefreie Kleberdispersionen in Na-salicylatlösung nicht durch-

sichtig sind. Erst durch Zentrifugieren bei 65ooo U.p.m. lassen sich diese Dispersionen klären. Dies kann also nur in der Ultrazentrifuge erreicht werden. In Lösung bleiben maximal 84% des im Kleber vorhandenen Proteins. Beim Zentrifugieren scheiden sich die nicht molekular gelösten Kleberteilchen ab. Vermutlich ist dieser Anteil identisch mit jenen 10-12% Protein, welche Blish als Verlust beim Zentrifugieren bezeichnete.

6. Fraktionierungen des Klebers und seiner Proteine.

Trotzdem das ideale Lösungsmittel für den Kleber noch nicht gefunden werden konnte, glaubten verschiedene Forscher, mit Hilfe von Fraktionierungsmethoden einen besseren Einblick in die Zusammensetzung dieses Produktes zu erhalten.

A. Die Fraktionierung von Gliadin.

Eine weitgehende Fraktionierung dieses Kleberproteins erreichten Haugaard & Johnson (1930). Sie liessen eine Gliadinlösung in wässerigem Alkohol einige Tage bei 0° stehen. Hierbei schied sich das Protein teilweise ab. Die abdekantierte Flüssigkeit wurde anschliessend längere Zeit auf -11° abgekühlt. Es bildete sich erneut ein Niederschlag. In der jetzt verbleibenden Lösung war jedoch immer noch etwas Protein gelöst.

Die einzelnen Fraktionen unterschieden sich deutlich in ihrer Löslichkeit, in der Viscosität und im osmotischen Druck.

Soerensen (1930) teilte das Gliadin nach derselben Methode in drei Teile auf. Die zuerst ausfallende Fraktion, welche also am schwersten löslich ist, wurde als Fraktion I bezeichnet. Jener Anteil, der auch bei -10° in Lösung blieb, bildete die Fraktion IV. Das als Ausgangsmaterial verwendete Gliadin stellte die Fraktion III dar.

Die Versuche von Soerensen bilden eine gute Bestätigung der von Haugaard & Johnson gefundenen Resultate. Es zeigte sich, dass jedes der vier Produkte eine eigene Viscositätskurve aufwies. Die Viscosität der am besten löslichen Fraktion IV nahm am wenigsten zu mit steigender Proteinkonzentration, während die Fraktion I die grösste Viscositätszunahme aufwies.

Die vier Kleberfraktionen wurden anschliessend hydrolysiert. Einzelne Spaltprodukte variierten in der gleichen Reihenfolge wie die Löslichkeit der Fraktionen.

Fraktionen:	I	II	III	IV
In Säure unlösl. Humin-N	0,36	0,09	0,06	0,03 %
In Säure löslicher Humin-N	0,28	0,29	0,40	0,46 %
Ammoniak-N	25,03	26,03	26,17	26,27 %
Tyrosin-N	0,86	1,18	1,23	1,32 %
Tryptophan-N	1,41	1,10	1,02	0,84 %

Allerdings sind die Unterschiede kleiner, als der Verfasser erwartet hat.

Krejci & The Svedberg (1935) untersuchten das Gliadin sehr eingehend in der Ultrazentrifuge. Sie verwendeten das nach der Methode von Dill & Alsberg isolierte Protein. Dieses fraktionierten sie nach der Methode von Haugaard & Johnson, und prüften jede einzelne Fraktion. Für alle diese Produkte ermittelten sie das Sedimentationsgleichgewicht und die Sedimentationskonstante.

Bei allen Untersuchungen zeigte sich, dass das Gliadin ein polydisperses Protein ist. Die Verfasser gelangten auf Grund ihrer umfangreichen Untersuchungen zu dem Schlusse:

Bei p_H 2,23 und darüber, sowie bei 20° und darunter, beträgt das mittlere Molekulargewicht 26ooo. Hier scheint eine Mischung von ganzen und halben Molekülen vorzuliegen. Bei höheren Temperaturen und grösserer Acidität ist die Dissoziation in halbe Moleküle vom Gewicht 17250 vollständig. Die ganzen Moleküle haben also ein Gewicht von 34500.

Kugelige Moleküle mit einem Gewicht von 34500 müssten eine Sedimentationskonstante von $3{,}54 \cdot 10^{-13}$ aufweisen. Da Gliadin die ungewöhnlich niedrige Sedimentationskonstante von $2{,}10 \cdot 10^{-13}$ besitzt, kann dieses Protein nur längliche Moleküle haben.

Die vier von Soerensen beschriebenen Gliadinfraktionen unterschieden sich ganz deutlich in der Ultrazentrifuge. Bei Messungen der Sedimentationskonstante konnten in der leichtestlöslichen Fraktion IV gar keine schweren Moleküle nachgewiesen werden. Die dritte Fraktion enthielt 20-25%, die zweite Fraktion 37% und die erste Frak-

tion 40-49% schwere, d.h. ganze Moleküle. Die schwerstlösliche Fraktion I enthielt also am meisten ganze Moleküle.

Bei der Fraktion IV wurde auch das Sedimentationsgleichgewicht bei p_H 2,40 und bei 20° bestimmt. Auf diese Weise liess sich auch hier eine Polydispersität nachweisen. Da jedoch die schweren Moleküle bei der Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit nicht erfasst werden konnten, muss ihre Konzentration in der Fraktion IV niedriger als 5-8% sein.

Diese Untersuchungsergebnisse veranschaulichen ganz deutlich, dass das Gliadin nach der Fraktionierungsmethode von Haugaard & Johnson in mehrere Anteile zerlegt werden kann. Die verschiedenen Fraktionen weisen auch unverkennbare Unterschiede auf.

Ergänzend seien noch die auf osmotischem Wege ermittelten Molekulargewichte für Gliadin aufgeführt.

Duclaux & Dobry (1938) fanden in Essigsäure ein mittleres Molekulargewicht von 40000.

Norval Burk (1938) ermittelte für hochgereinigtes Gliadin im isoelektrischen Zustande ein Molekulargewicht von 41000. In Harnstofflösung erhöhte sich der Wert auf 44000. In 75%iger Glycerinlösung wurde bei 30° ein Molekulargewicht von 67000, in gepufferter Urethanlösung bei 0° ein solches von 75000 gefunden.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Gliadinteilchen in den verschiedenen Lösungsmitteln nicht einen einheitlichen Aggregationszustand aufweisen.

B. Fraktionierungen von dispergiertem Kleber.

Sandstedt & Blish (1933) dispergierten den Kleber in 0,05n Essigsäure, die 55% Alkohol enthielt. Nach der Zugabe einer bestimmten Menge NaCl wurde die Lösung bei 12° stehen gelassen. Dabei schied sich eine leicht abzentrifugierbare Proteinfraktion ab. Die verbleibende Lösung wurde zunächst auf 4°, und dann auf -12° abgekühlt, sodass zwei weitere Fraktionen abgetrennt werden konnten.

Bei Verwendung von K_2SO_4 als Elektrolyten, erfolgte die erste Ausfällung bereits bei 19°. Die folgenden Fraktionen fielen bei entsprechend höheren Temperaturen aus.

Wurde der Aethylalkohol ersetzt durch Methylalkohol, so war überhaupt keine Temperaturerniedrigung notwendig. Durch Neutralisation der methylalkoholischen Essigsäure fielen die Proteine sofort aus, was bei der Anwesenheit von Aethylalkohol nicht der Fall war.

Die Verfasser fanden durch Variationen der Fällungsbedingungen ganz unterschiedliche Fraktionen. Trotzdem waren sie der Ansicht, dass sich diese Fraktionen nach ihren Eigenschaften in drei Hauptgruppen einteilen lassen:

Die Glutenin-fraktion stellte ungefähr 25% der Kleberproteine dar. Sie war unlöslich in Alkohol.

Die Gliadin-fraktion umfasste 45-55% des Klebers. Diese war gut löslich in 50-70%igem Alkohol und in verdünnter Essigsäure.

Die Mesonin-fraktion, 25% darstellend, war wenig löslich in Alkohol, löste sich aber vollständig in Essigsäure.

Sellers (1933) hat es unternommen, zwei der von Sandstedt & Blish dargestellten Kleberfraktionen zu hydrolysieren. Die Glutenin- und die Mesonin-gruppe unterschieden sich sehr deutlich. Sie wiesen beispielsweise im Amino-N-gehalt eine Differenz von 4,5% auf.

Harris & Bailey (1936) sowie Stockelbach & Bailey (1938) bedienten sich ebenfalls der soeben beschriebenen Fraktionierungsmethode. Die Verfasser stellten übereinstimmend fest, dass sich die verschiedenen Fraktionen im N-gehalt und in ihren Hydrolysenprodukten unterschieden.

Inzwischen gelangte Blish (1936) auf Grund besonderer Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass der Alkohol im obigen Dispersionsmittel eine irreversible Spaltung einer wichtigen Kleberkomponente bewirke. Es handelt sich hierbei um ein Lecithin-protein oder einen ähnlichen Lipoid-protein-komplex.

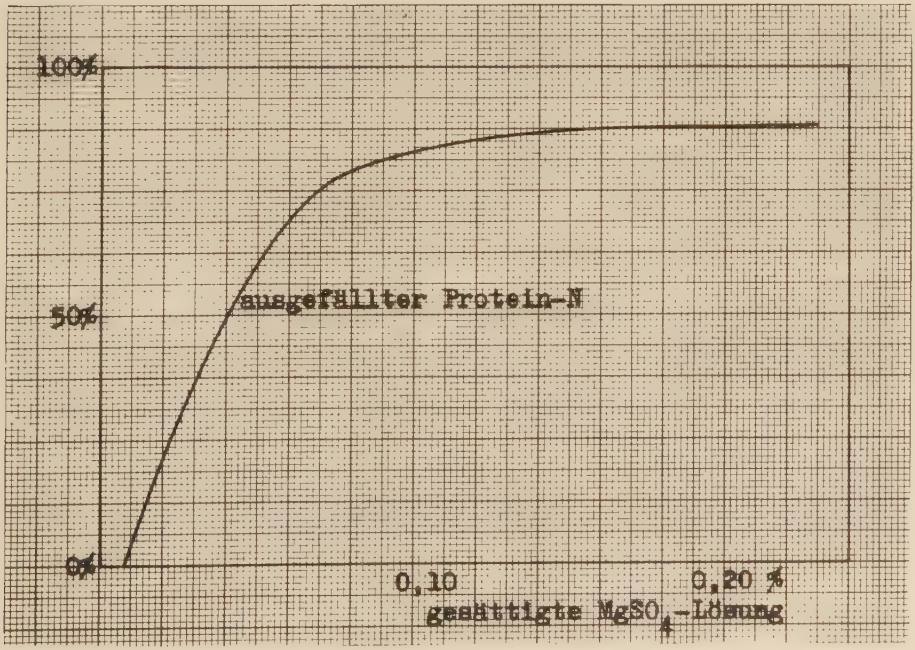
Dieser Kleberkomponente wurde bisher viel zu wenig Beachtung geschenkt. Mit grösster Wahrscheinlichkeit ist die durch den Alkohol verursachte Spaltung dieses Komplexes verantwortlich zu machen für die tiefgreifenden Aenderungen der Löslichkeit und der kolloidalen Eigenschaften wichtiger Kleberbestandteile. Der rohe Kleber enthält 5-10% dieses Lipoides. In einigen Lösungen gelangen Blish Anreicherungen bis zu 37 und 44%.

Auch Bungenberg de Jong (1939) hebt hervor, dass Lecithin einen nicht zu vernachlässigenden Faktor für das Kleberproblem darstellt.

Ganz ähnliche Methoden wurden angewendet, um den Kleber aus Na-salicylatdispersionen auszufällen.

Mc Calla & Rose (1935) dispergierten den Kleber in 10%iger Na-salicylatlösung nach der früher beschriebenen Methode (siehe Seite 12). Dann wurde diese Lösung während 20min. bei 2500 U.p.m. abzentrifugiert. Nachher wurde das Protein fraktioniert ausgefällt durch Zugabe zunehmender Mengen einer bei 20° gesättigten $MgSO_4$-Lösung. Die gut durchgeschüttelte Mischung blieb anschliessend 22 std. bei 1° stehen. Das ausgefällte Produkt konnte durch Abzentrifugieren von der Lösung getrennt werden.

Es zeigte sich, dass die ausgefällte Proteinmenge annähernd proportional der fällenden $MgSO_4$-Menge zunimmt. Jedoch konnten nur 85-90% des dispergierten Klebers wieder ausgefällt werden. Die folgende Kurve gibt Aufschluss über das Verhältnis von zugefügter Salzmenge und ausgefällter Proteinmenge:



Bei diesen Ausfällversuchen stellte sich heraus, dass zunehmende Mengen $MgSO_4$ Fraktionen ausfällten, die zunehmende Mengen Amid-N und gleichzeitig abnehmende Mengen Arginin-N aufwiesen.

Die einzelnen Fraktionen wurden wieder in Lösung gebracht, und die einzelnen Lösungen vereinigt. Dann wurde mit viel $MgSO_4$-Lösung der Gesamtkleber ausgefällt. Das erhaltene Produkt unterschied sich von dem ursprünglichen Kleber durch seine Stärkefreiheit. Ferner war es etwas zäher, aber weniger elastisch.

Mit diesen Versuchen konnten die Verfasser nachweisen, dass praktisch jeder Prozentsatz des dispergierten Klebers mit $MgSO_4$ ausgefällt werden kann. Die erhaltenen Fraktionen unterschieden sich kontinuierlich. Diese Tatsache spricht also gegen die frühere Auffassung von Osborne: der Kleber setze sich aus zwei Proteinen zusammen.

Mc Calla & Nils Gralén (1940) fraktionierten den Kleber nach derselben Methode. Die einzelnen Fraktionen untersuchten sie in der Ultrazentrifuge.

Die löslichste Fraktion stellte 23% der Kleberproteine dar. Sie hatte ein mittleres Molekulargewicht von 44000. Die folgenden Fraktionen wiesen mit fortschreitender Abnahme der Löslichkeit ein stark zunehmendes Molekulargewicht auf.

Die Verfasser kamen zu dem Schlusse, dass im Kleber mehrere Molekülgrössen vertreten seien. Diese Erscheinung erachteten sie als weitere Stütze für die Auffassung,

dass der Kleber nicht aus Gliadin und Glutenin zusammengesetzt sei.

7. Die Isolierung von Gliadin und Glutenin.

Ritthausen engte seine alkoholischen Kleberextrakte nach der Filtration unter vermindertem Druck etwa auf die Hälfte ein. Die Alkoholkonzentration durfte jedoch nicht unter 40-50% herabsinken, weil sonst ein Teil des Proteins in eine unlösliche Modifikation überging. Wenn sich die Lösung zu trüben begann, musste starker Alkohol zugegeben werden. Nach dem Erkalten der Gliadinlösung schied sich das Protein als zähschleimige Masse ab. Diese wurde in verdünnter Essigsäure gelöst. Die Lösung blieb hierauf so lange bei 4-5° stehen, bis sie sich geklärt hatte. Durch Zugabe von Kaliwasser wurde das Gliadin in der klaren Lösung gefällt. Der Niederschlag wurde mit abs. Alkohol, dann mit Aether, und schliesslich nochmals mit abs. Alkohol behandelt, bis er vollständig wasserfrei war. Ueber Schwefelsäure getrocknet, wurde haltbares und gut lösliches Gliadin erhalten.

Osborne engte seine alkoholischen Kleberextrakte ebenfalls unter vermindertem Druck ein. Der dicke Sirup wurde in das 6-8fache Volumen eiskalten Wassers gegossen. Der Niederschlag wurde nochmals in 70%igem Alkohol gelöst, eingeengt und wieder gefällt. Die Entwässerung und

die Trocknung erfolgten in der gleichen Weise, wie dies Ritthausen beschrieben hat.

Ritthausen und Osborne stellten das Glutenin nach der gleichen Methode dar. Der nach der alkoholischen Extraktion verbleibende Rückstand wurde in Kaliwasser gelöst und geklärt. Mit Essigsäure wurde wieder ausgefällt. Der Niederschlag wurde nun erschöpfend mit 70%igem Alkohol extrahiert, bis gar kein Gliadin mehr in Lösung ging. Der jetzt verbleibende Rückstand wurde mit abs. Alkohol entwässert und über H_2SO_4 getrocknet. Dieses Produkt stellte das Glutenin dar.

Die früher in dieser Arbeit beschriebenen Vor- und Nachteile der einzelnen Lösungsmittel berücksichtigend, kann man heute sagen, dass diese Darstellungsmethoden nicht mehr befriedigen können. Die Proteine sind zu sehr den denaturierenden Wirkungen des wässerigen Alkohols und der verdünnten Kalilauge ausgesetzt.

Dill & Alsberg konzentrierten ihre klaren Lösungen ebenfalls unter vermindertem Druck. Die Extrakte wurden nach der früher bereits beschriebenen Methode geklärt und ausgefällt. Der Niederschlag wurde in möglichst wenig 60%igen Alkohols gelöst. Das Protein wurde jetzt nicht mehr in einer 1%igen NaCl-Lösung ausgefällt, sondern als Elektrolyt wurde LiCl verwendet. Dieses Salz liess sich vor der endgültigen Trocknung des Gliadins viel besser abtrennen.

Das ausgefällte Protein wurde nochmals in 60%igem Alkohol gelöst. Jetzt erfolgte die Ausfällung durch Eingiessen dieser Lösung in das vierfache Volumen abs. Alkohols. Der Alkohol enthielt auch 0,025% LiCl. Das Lösen in 60%igem Alkohol und das Ausfällen in abs. Alkohol wurden noch zweimal wiederholt. Zur vollständigen Entwässerung wurde das Gliadin zweimal in frischem abs. Alkohol ausgeknetet. Schliesslich wurde mit trockenem Aether nachbehandelt, und im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet.

Nach dieser Darstellungsmethode wurden jene Gliadinpräparate erhalten, welche wasserklare Lösungen ergaben. Diese blieben auch während einem Monat immer klar.

Eine weitere Darstellungsmethode für Gliadin verwendete Troensegaard (1931). Er isolierte sein Gliadin durch Ausfrieren der vorher geklärten Extrakte bei -15°. Die hohen spezifischen Drehwerte sprechen für eine sehr grosse Reinheit seiner Präparate.

8. Die Entwicklung der Theorie von Soerensen über die reversibel dissoziablen Komponentensysteme löslicher Proteine.

Um 1928 versuchten Meyer & Mark Strukturmodelle für Zellulose und andere hochpolymere Stoffe aufzustellen. Um die gleiche Zeit untersuchte Staudinger synthetisch dargestellte Polymerisationsprodukte von wohlbekannten, einfach gebauten Ausgangsprodukten. Die Ergebnisse dieser Forscher

ergänzten sich vorzüglich. Sie gelangten zu dem Schlusse, dass die Makromoleküle aus Hauptvalenzketten aufgebaut seien. Diese Ansicht basierten sie auf die klassische Theorie des Molekülbegriffes.

Schon einige Jahre vorher vertraten Herzog, Karrer und Hess, ganz unabhängig voneinander, eine andere Auffassung: die hochmolekularen Substanzen bestehen aus verhältnismässig kleinen Strukturelementen; diese werden durch assoziierende Kräfte zu grösseren Aggregaten zusammengehalten. Diese Forscher übertragen also die Werner'sche Koordinationstheorie auf die hochmolekularen Stoffe der organischen Chemie. Demnach werden die einzelnen Atome und Atomgruppen durch Hauptvalenzen fest miteinander verbunden. Die entstehenden Bausteine werden dann durch Nebenvalenzen in grösseren Einheiten zusammengehalten.

Soerensen (1930) versuchte, den Bau der löslichen Proteine ebenfalls im Sinne der Koordinationstheorie zu deuten. Er untersuchte Eiweisskörper, die sich ohne irreversible Spaltungen in Alkohol oder Wasser auflösen lassen. Auf Grund von umfangreichen Studien an verschiedenen Proteinen stellte er folgende Theorie auf:

"Die löslichen Proteine bestehen aus mehreren Komponenten oder Komplexen. Diese sind reversibel miteinander verbunden. Innerhalb eines jeden Komplexes (hauptsächlich Polypeptide) sind alle Atome und Atomgruppen durch Hauptvalenzen miteinander verbunden. Die einzelnen Komplexe, welche den Eiweisskörper bil-

den, sind locker und reversibel durch Restvalenzen verknüpft.

Man muss annehmen, dass die Bindungen zwischen den Komplexen relativ schwach sind. Schon Aenderungen in der Zusammensetzung der Lösung (Salzgehalt, Alkoholgehalt, H°-Konzentration, Temperatur) bewirken leicht reversible Dissoziationen, die auch zum Austausch einzelner Komponenten oder Komplexe führen können. Leitet man die Aenderungen in der Zusammensetzung der Lösung so, dass sich ein unlösliches oder schwerlösliches Komponentensystem bilden kann, so wird dieses ausgefällt werden."

Viele Versuche von Soerensen bestätigen seine Theorie sehr gut. Er berücksichtigte auch die von The Svedberg mit Hilfe der Ultrazentrifuge ermittelten Molekulargewichte. Diese unterstützten seine Ansicht ebenfalls weitgehend. Trotzdem enthält die Arbeit von Soerensen einige Tatsachen, die sich vorläufig noch nicht mit seiner Theorie vereinbaren lassen.

9. Neuere Anschauungen über die Zusammensetzung des Klebers.

Während eines Vierteljahrhunderts, von ungefähr 1900 bis 1925, wurde allgemein vorausgesetzt, dass die Identität und Individualität der Weizenproteine genau festgesetzt sei. Man stützte sich auf die gründlichen Untersuchungen von Os-

borne (1893-1909). Damals betrachtete man den Kleber als eine aus zwei Komponenten zusammengesetzte Mischung. Diese Mischung von Gliadin und Glutenin sollte 80-85% der im Weizenmehl vorhandenen Proteine darstellen. Die restlichen 10-15% wurden als nicht zum Kleber gehörende, wasserlösliche Eiweisskörper bezeichnet. Sie sollen ein Gemenge von Edestin und Leukosin umfassen.

Seit 1925 wurde dem Kleberproblem viel grössere Aufmerksamkeit geschenkt. Mit Hilfe inzwischen gesammelter Erfahrungen, sowie unter Heranziehung sehr verfeinerter physikalisch-chemischer Methoden, gelangte man zu ganz anderen Anschauungen. Die neuesten Untersuchungsergebnisse unterstützten die Erfahrungen von Osborne immer weniger.

Aus den bisher aufgeführten Versuchen und Ergebnissen geht deutlich hervor, welche Schwierigkeiten zu überwinden waren und noch zu überwinden sind, bis die Zusammensetzung des Weizenklebers restlos abgeklärt sein wird. Je mehr die verschiedenen Forscher in die Materie eindrangen, um so komplizierter gestaltete sich die Uebersicht aller Befunde, und ihre Deutung.

Sandstedt & Blish konnten bei ihren Fraktionierungsversuchen zeigen, dass es keine festgesetzten Grenzen gibt für die Variationen der Fällungsbedingungen. Der in alkoholischer Essigsäure dispergierte Kleber liess sich in ganz willkürliche Fraktionen aufteilen. Jede Fraktion wies wieder andere Eigenschaften auf.

Daher schlossen sich die Verfasser der Theorie von

Soerensen an. Sie betrachteten den Weizenkleber als dissoziables Komponentensystem. Ihrer Ansicht nach sind im Kleber drei Hauptkomponentensysteme: Glutenin, Mesonin und Gliadin. Jedes System umfasst eine Gruppe von weniger dissoziablen Komponenten oder Komplexen. Dass dieses System auch dissoziabel ist, hatten Haugaard & Johnson durch ihre Gliadinfraktionierung bewiesen.

Nach Mc Calla & Rose enthält der Kleber 20-30% Proteine, die sich durch eine besonders grosse Löslichkeit auszeichnen. Vermutlich sind sie nicht an der Kleberbildung beteiligt. In ihrem Verhalten unterscheiden sie sich grundsätzlich von den übrigen Proteinen.

Dass sich die mit zunehmenden Mengen $MgSO_4$ ausgefällten Fraktionen so kontinuierlich in ihrem Gehalt an Amid- und Arginin-N unterscheiden, erachten sie als Beweis dafür, dass der Kleber nicht nur aus den zwei Proteinen Gliadin und Glutenin aufgebaut sein könne. Wenn wirklich zwei Proteine vorhanden wären, müssten sich Fällungsbedingungen finden lassen, bei welchen der Niederschlag die gleiche prozentuale Zusammensetzung an Gliadin und Glutenin aufweisen würde wie der ursprüngliche Kleber. Dies war jedoch nie der Fall.

Auch Mc Calla & Rose äusserten die Ansicht, dass der Kleber als ein hochdissoziables System anzusprechen sei. Es gelang ihnen, den Kleber in viele zunehmend verschiedene Fraktionen aufzuteilen. Durch Vereinigung der Fraktionen erhielten sie wieder annähernd den ursprünglichen Kleber zurück. Also wäre auch die Reversibilität

weitgehend erwiesen.

Blish wechselte seine Ansicht ebenfalls. Er verliess seine Behauptung, dass im Kleber drei Hauptkomponentensysteme vorliegen. Er schloss sich der Ansicht von Mc Calla & Rose an, dass im Kleber unzählige Komponenten vorhanden seien.

Mc Calla & Nils Gralén konnten bei ihren Kleberfraktionen in Na-salicylatlösung mit Hilfe der Ultrazentrifuge nachweisen, dass die Grösse der Moleküle sehr unterschiedlich war. Aus diesem Grunde verwarfen sie ebenfalls die Anschauung von Osborne. Sie betrachteten ihre Untersuchungsergebnisse vielmehr als eine Stütze dafür, dass der Kleber ein Proteinsystem darstelle, dessen Komponenten in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften regelmässig und systematisch schwanken.

Dieser Rückblick zeigt, dass man von den Anschauungen Osborne's Abstand genommen hat. Die heutigen Ansichten über die Zusammensetzung des Weizenklebers sind jedoch noch weit davon entfernt, endgültig abgeklärt zu sein. Man bekommt eher den Eindruck, dass sich die Forscher an den Begriff "reversibel dissoziable Komponentensysteme" geklammert haben, um vorläufig nicht in dem grossen Strudel von Tatsachen und Ungewissheiten unter zu gehen.

III. Eigene Untersuchungen und ihre Ergebnisse.

1. Die Isolierung des Klebers aus dem Weizenmehl.

Als Ausgangsmaterial diente weisses Semmelmehl. Dieses wurde in freundlicher Weise von Herrn Ackermann, Müller in Dottikon, zur Verfügung gestellt.

Zuerst wurde dieses Mehl gesiebt. Als Sieb diente Müllerseide No.12. Auf diese Weise konnten grosse Mengen Kleie abgetrennt werden. Enthielt der ausgewaschene Kleber viel Kleieteilchen, so wurden stets braun gefärbte Extrakte erhalten.

100gr des gesiebten Mehles wurden mit 60-70ccm gewöhnlichen Wassers zu einem steifen Teig verarbeitet. Es soll möglichst wenig Wasser verwendet werden. Der Teig muss aber gut durchgeknetet werden, bis er einen zusammenhängenden Klumpen bildet. Wurde mehr Wasser zugegeben, so ergab sich ein dünner Brei. Dieser liess sich unter fliessendem Wasser nicht auswaschen.

Der zähe Teigklumpen wurde vorerst eine halbe Stunde sich selbst überlassen. In dieser Zeit vollzog sich eine Quellung der Kleberteilchen. Dadurch wurden Zähigkeit und Zusammenhalt des Teiges verbessert.

Dann folgte das Auswaschen der Stärke. Der Teig-

klumpen wurde unter einem feinen Strahl kalten Wassers zwischen beiden Händen gut durchgeknetet und ausgequetscht. Je mehr Stärke und Kleie bereits ausgewaschen sind, um so zäher wird die Teigmasse. Es wurde so lange ausgewaschen, bis das Abwasser vollständig klar war. Nach ca. 30min. war dies meistens der Fall. Längeres Auswaschen ist nutzlos, denn die Stärke lässt sich nie quantitativ abtrennen.

Auf diese Weise liessen sich aus dem Semmelmehl 28-30% Feuchtkleber auswaschen. Dieser enthält nach übereinstimmenden Angaben mehrerer Forscher 67% Wasser. Wird diese Wassermenge in Abzug gebracht, so ergeben 100gr Semmelmehl 9-10gr Trockenkleber. Zum Vergleich sei angeführt, dass Ritthausen aus seinen Weizenmehlsorten 9-15% Trockensubstanz isolieren konnte.

Es wurde auch versucht, aus dem durch den Krieg bedingten Vollmehl den Kleber auszuwaschen. Dieses Mehl war nicht weiss, sondern rosa gefärbt. Es enthielt sehr viel Kleie und etwas Roggenmehl. Es konnte gar kein richtiger Teigklumpen hergestellt werden. Beim Auswaschen der Stärke traten grosse Kleberverluste ein, weil die Teigmasse zu wenig Zähigkeit besass. Die Extrakte aus diesem Kleber waren immer stark braun gefärbt. Dieses Vollmehl eignete sich nicht für die folgenden Untersuchungen.

2. Alkoholische Extraktionen des Klebers.

Der frische Feucht-kleber wurde zuerst in kleinere

Stücke zerzupft. Diese blieben über Nacht in 70%igem Alkohol stehen. Anderntags wurden diese Kleberstücke im Alkohol mit zwei Pinzetten in feinste Teilchen zerkleinert. Der jetzt mit Alkohol durchtränkte Kleber hatte bereits sehr viel von seiner Zähigkeit verloren. Daher liess sich die erforderliche Zerkleinerung viel besser bewerkstelligen.

Für 100gr Feuchtkleber wurden 500ccm Alkohol verwendet.

Aus der Arbeit von Dill & Alsberg geht hervor, dass das Gliadin in 63vol%igem Aethylalkohol die grösste Löslichkeit aufweist. 100gr Feuchtkleber enthalten 67gr Wasser. Diese Wassermenge genügte gerade, um 500ccm 70%igen Alkohols auf die erforderliche Konzentration von genau 63% zu verdünnen.

Die Extraktion wurde auf einer Schüttelmaschine durchgeführt. In einer gut schliessenden Flasche wurde der Kleber mit dem Alkohol 6-8 std. kräftig geschüttelt. Diese mechanische Bearbeitung begünstigte gleichzeitig eine weitere Zerkleinerung der Kleberteilchen.

Der ungelöste Rückstand wurde mit Hilfe von Müllerseide von der Lösung abgetrennt und gut ausgequetscht. Dieser ungelöste Kleber wurde anschliessend noch zweimal mit je 200ccm Alkohol auf der Schüttelmaschine extrahiert. Diese Extrakte enthielten jedoch bedeutend weniger Gliadin.

Anfänglich wurde auch käuflicher Kleber mit Alkohol

extrahiert. Dieses Produkt ist von der Firma Blattmann in Wädenswil hergestellt worden. Es war nicht ganz stärkefrei, zeichnete sich aber durch grosse Zähigkeit und Elastizität aus.

Der käufliche Kleber wurde nach der gleichen Methode extrahiert wie der Feuchtkleber.

Andere Extraktionsmethoden wurden ebenfalls herangezogen. Weder längeres Stehenlassen unter wiederholtem Auskneten, noch Ausrollen mit einem schweren Rollkörper ergaben die gleiche Gliadinausbeute wie die Methode des Ausschüttelns.

3. Die Reinigung der alkoholischen Extrakte.

Die rohen Kleberextrakte waren stark getrübt und ganz undurchsichtig. Eine schwach gelbliche Färbung war immer vorhanden. Die Kleieteilchen konnten also weder durch Sieben, noch durch die folgende Auswaschung vollständig abgetrennt werden.

Die Klärung der alkoholischen Extrakte bereitete ausserordentliche Schwierigkeiten. Die Trübung wird verursacht durch suspendierte Stärke, denaturiertes Gliadin und ungelöste Kleberteilchen. Die Stärke und das denaturierte Gliadin bilden so feine Suspensionen, dass sie weder durch gewöhnliche Filtration, noch durch Zentrifugieren bei 2500 U.p.m. abgetrennt werden können. Die unge-

lösten Kleberteilchen sind derart gallertig, dass sie die Filterporen sogleich verstopfen.

Schliesslich zeitigten die beiden folgenden Methoden die besten Ergebnisse:

Methode A:

Der alkoholische Extrakt wurde über Nacht stehen gelassen. Hierbei setzte sich ein grosser Teil des suspendierten Materials zu Boden. Dann wurde die immer noch undurchsichtige Lösung vorsichtig abgehebert. Diese Lösung wurde nun mit 1-1,5 Atm. Ueberdruck durch zweifaches Filtrierpapier aus Kieselgur gepresst. Wurde diese Filtration mehrmals wiederholt, so verschwand die Trübung bis auf eine schwache Opaleszenz.

Wenn die Filtration bei Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) durchgeführt wurde, so begann die Lösung sofort zu schäumen.

Die von Osborne beschriebene Filtrationsmethode wurde ebenfalls ausprobiert. Auf eine Glasfritte wurde eine dicke Schicht von Papierpulpe aufgeschlämmt. Diese filtrierende Schicht verlor mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe ihr Wasser, und backte filzartig zusammen. Vor der Filtration wurde der Filter zuerst mit der reinen Extraktionsflüssigkeit getränkt.

Diese Filtrationsmethode konnte jedoch nicht befriedigen. Wenn die filtrierende Schicht zu dick aufgetragen wurde, so konnte die Flüssigkeit gar nicht durchfliessen. War die Schicht dagegen zu dünn, so erschien

die durchfliessende Lösung immer noch trübe. Wenn schliesslich die richtige Schichtdicke gefunden worden war, so arbeitete sich dieser Filter sehr rasch tot. Die Filtration mit Kieselgurpapier war dagegen nicht so umständlich.

Methode B:

Diese Methode wurde von Dill & Alsberg beschrieben. Die alkoholischen Extrakte wurden 48 std. bei +5° stehen gelassen. Hierbei nahm die Trübung stark zu. Etwas Gliadin setzte sich als Bodenkörper ab. Auch in der Lösung schwebten noch Gliadinflocken. Die kalte Lösung wurde rasch filtriert. Nach der Filtration war die Lösung immer noch trübe. Wurde sie dann wieder auf 20° erwärmt, so trat meistens eine vollständige Klärung ein.

War diese Lösung immer noch etwas getrübt, so wurde sie nochmals 24 std. bei +5° stehen gelassen. Nach der Filtration war sie bei 20° schliesslich doch ganz klar.

Das sich beim Stehenlassen ausscheidende Gliadin wurde in frischem Alkohol gelöst. Diese Lösung blieb neuerdings bei +5° stehen. Dabei schied sich schon bedeutend weniger Gliadin ab. Auf diese Weise liessen sich grössere Proteinverluste vermeiden.

Beide Methoden erfordern viel Geduld und Uebung. Vielleicht werden mit Hilfe der jüngst im Laboratorium aufgestellten Superzentrifuge, die 40ooo U.p.m. zulässt, auf einfacherem Wege bessere Resultate erreicht.

4. Die Isolierung von Gliadin.

Auch hierfür eignete sich die Methode von Dill & Alsberg am besten. Allerdings wurde bei der Ausfällung des Gliadins von der Zugabe eines Elektrolyten abgesehen. Wurde nämlich das ausgefällte Protein wieder in Alkohol gelöst, so wirkte die Anwesenheit von NaCl störend. Die Lösungen waren nie vollständig klar.

In einen grossen Schütteltrichter wurde 1 lt Eiswasser gegeben. Dazu wurden 200ccm des geklärten Extraktes gegossen, wobei das Wasser ganz milchig wurde. Nachher wurde 1-2 min. kräftig geschüttelt. Das Gliadin schied sich als zäher Schaum ab. Das Wasser klärte sich hierbei weitgehend.

Wenn sich der Schaum gesammelt hatte, wurde das Wasser abgelassen. Anschliessend wurden wieder 200ccm Extrakt mit 1 lt Eiswasser geschüttelt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Gliadin aus der gesamten Extraktmenge ausgefällt war. So konnte das Protein aus einer grösseren Menge Extrakt in dem Schütteltrichter angesammelt werden.

Schliesslich wurde der Gliadinschaum noch mit frischem Eiswasser ohne Alkohol durchgeschüttelt. Dann wurde das Wasser möglichst weitgehend abgetrennt. Nun wurde so viel 70%igen Alkohols zugegeben, bis sich das Gliadin restlos auflöste. Diese Lösung wurde nochmals in das fünffache Volumen Eiswasser gegossen, und durch Schütteln das Pro-

tein wieder ausgefällt. Wenn sich der jetzt ausgefällte Schaum nicht wasserklar in 70%igem Alkohol auflöste, so wurde diese Lösung nochmals 48 std. bei +5° stehen gelassen. Nachher wurde die soeben beschriebene Aufarbeitung einfach wiederholt.

In einem Spezialfalle wurde das Gliadin nicht nur einmal, sondern fünfmal umgefällt. Nach jeder Ausfällung wurde eine kleine Probe des Proteins abgetrennt, entwässert und getrocknet. Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob das Umfällen wirklich zur Reinigung des Gliadins beiträgt. Wie sich später zeigen wird, hatten diese Umfällungen ganz andere Folgen.

Die ganz klare alkoholische Lösung wurde nun in das vierfache Volumen abs. Alkohols gegossen. Zuerst schied sich das Protein honigartig ab. Je mehr die Entwässerung durch den abs. Alkohol fortschritt, um so weisser und krümeliger wurde das Gliadin. Dieses Produkt wurde abfiltriert, zerkleinert und nochmals in abs. Alkohol ausgeknetet. Wenn diese Teilchen gar keine Elastizität mehr aufwiesen, so war die Entwässerung beendet.

Die jüngsten Erkenntnisse auf dem Gebiete der Fadenmoleküle zeigten, dass die eigenartige lineare Molekülform diesen Stoffen auch in fester Form besondere Merkmale verleihen kann. Wird die Lösung eines derartigen Produktes in feinem Strahle in ein Fällungsmittel gegossen, so erfolgt die Abscheidung in Form von langen, biegsamen,

nicht pulverisierbaren Fasern. Dies wurde erkannt bei Nitrocellulose, Nucleinsäure und Polystyrol.

In unserem Falle wies das Gliadin keine Fasern auf. Als trockenes Produkt liess es sicht leicht zu einem feinen Pulver zerreiben. Schon diese Erscheinungen sprechen also dafür, dass dieses Protein keine ausgesprochenen Fadenmoleküle aufweisen kann.

Das in abs. Alkohol vollständig entwässerte Gliadin wurde schliesslich im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet. Wenn die Entwässerung des Proteins nicht vollständig durchgeführt wurde, so bildete das Gliadin nach der Trocknung ein bräunlich-glasiges Produkt. Dieses zeichnete sich durch eine geringere Löslichkeit aus. Andernfalls wurde ganz weisses, staubfein pulverisierbares Gliadin erhalten. Dieses war gut löslich und lange haltbar.

Osborne, sowie Dill & Alsberg haben ihre alkoholischen Kleberextrakte immer zuerst unter vermindertem Drukke eingeengt. Von dieser Methode wurde hier kein Gebrauch gemacht. Es hatte sich gezeigt, dass bei dem Einengen immer etwas Gliadin irreversibel verändert wurde. Ein kleiner Anteil des gelösten Proteins schied sich als feines Pulver ab. Wurde starker Alkohol zugegeben, um die anfängliche Alkoholkonzentration wieder herzustellen, so liess sich dieses Pulver nicht mehr in Lösung bringen. Das Einengen förderte also eine Denaturierung des Gliadins.

Anfänglich schien es sehr schwer zu sein, grössere

Mengen Gliadin aus dem Weizenkleber zu extrahieren. Bei Einhaltung der bisher beschriebenen Methoden konnten schliesslich bis 15% des im Kleber enthaltenen Proteins als Gliadin isoliert werden.

5. Denaturierende Wirkungen des Alkohols.

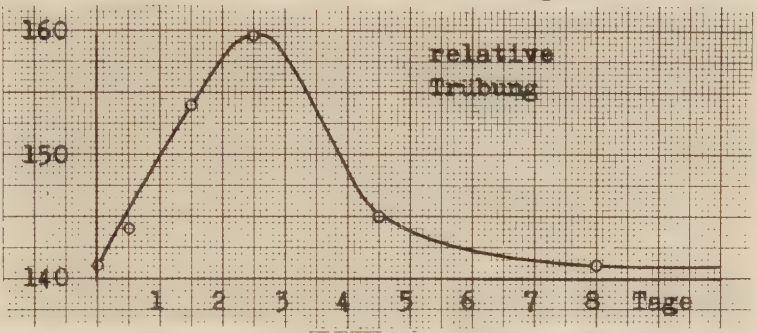
Schon Dill & Alsberg haben darauf hingewiesen, dass das Gliadin bei seiner Isolierung teilweise in eine unlösliche Modifikation übergeht. Sie bezeichneten diesen veränderten Anteil als denaturiertes Gliadin. Sie schenkten ihm jedoch keine grössere Aufmerksamkeit. Diese Unbeständigkeit alkoholischer Gliadinlösungen wurde hier etwas eingehender untersucht.

Zu diesem Zwecke wurden Gliadinpräparate verwendet, die nur nach der Methode A (siehe Seite 55) gereinigt worden waren. Der denaturierte Anteil des Gliadins war also nicht vollständig abgetrennt worden durch längeres Stehenlassen bei $+5^{\circ}$ wie bei der Methode B. Aus der Arbeit von Dill & Alsberg geht ja hervor, dass die nach ihrer Methode isolierten Gliadinpräparate in alkoholischer Lösung einen ganzen Monat immer klar blieben.

1 gr Gliadin wurde in 100ccm 70%igen Alkohols gelöst. Diese Lösung wurde längere Zeit bei 20° aufbewahrt. Anfänglich war diese Gliadinlösung fast ganz klar. Bald liess sich eine zunehmende Trübung feststellen. Nach fünf Tagen begann bereits eine Ausflockung. Die gebildeten

Flocken setzten sich zu Boden, und die Lösung erreichte schliesslich wieder die anfängliche Klarheit.

Diese Veränderungen liessen sich auch quantitativ verfolgen. Zu diesem Zwecke wurde das Nephelometer herangezogen. Werden die Messungen der relativen Trübung in einem Diagramm vereinigt, so ergibt sich folgendes Kurvenbild:



Weder durch Aufschütteln, noch durch Erwärmen auf 70° konnte dieser Niederschlag wieder aufgelöst werden. Durch Zentrifugieren liessen sich diese unlöslichen Flokken vollständig abtrennen. Es zeigte sich, dass sich 6 % des gelösten Gliadins in jene unlösliche Modifikation umgewandelt hatten.

Die durch Zentrifugieren geklärte Lösung wurde weitere 14 Tage bei 20° aufbewahrt. Es trat dabei gar keine Trübung mehr ein. Mit dem Nephelometer liess sich die Beständigkeit dieser Lösung nachweisen.

Bei den nephelometrischen Messungen der Trübung zeigte sich eine ausserordentliche Temperaturabhängigkeit der alkoholischen Gliadinlösungen. Wenn im Thermostaten des Nephelometers die Temperatur von 20° nicht genauestens eingehalten wurde, so waren reproduzierbare Messungen gar

nicht möglich. Sank die Temperatur nur um einige zehntels Grad, so nahm die Trübung augenblicklich stark zu.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde daher die Temperaturabhängigkeit alkoholischer Gliadinlösungen geprüft. Von einer 1%igen Gliadinlösung in 70%igem Alkohol wurden kleinere Anteile bei 45, 30, 20 und 0° längere Zeit aufbewahrt.

Die bei 30 und 45° aufbewahrten Lösungen zeigten nach acht Tagen nicht die geringsten Veränderungen. Diese beiden Lösungen blieben die ganze Zeit wasserklar.

Die bei 20° aufbewahrte Lösung zeigte die bereits beschriebene Trübungserscheinung mit Ausflockung.

Bei 0° trübte sich die Gliadinlösung viel rascher. Der abzentrifugierte Anteil betrug jetzt nicht nur 6%, sondern 9%. Bei dieser tiefen Temperatur hat sich auch ein Teil des Gliadins abgeschieden, der jedoch bei 20° wieder in Lösung gebracht werden konnte.

Diese Erscheinungen zeigen, dass das Gliadin bei höheren Temperaturen in alkoholischer Lösung nicht verändert wird. Je tiefer die Temperatur sinkt, um so schneller und reichlicher vollzieht sich die Bildung einer unlöslichen Modifikation des Gliadins.

Eine andere alkoholische Gliadinlösung enthielt 4% dieses Proteins. Diese Lösung war schon von Anfang an ziemlich trübe. Das dieser Lösung zu Grunde liegende Gliadinpräparat wurde bei seiner Isolierung weniger sorgfältig filtriert. Diese Lösung wurde ebenfalls 14 Tage bei

20° aufbewahrt. In dieser Zeit hatten sich 29% des gelösten Gliadins wieder ausgeschieden. Hierin kommt deutlich zum Ausdruck, dass dieses Gliadinpräparat, infolge der ungenügenden Filtration, schon in der Trockenform eine ansehnliche Menge des veränderten Produktes aufwies.

Nach 14 Tagen wurde diese Lösung zentrifugiert. Die trübenden Teilchen konnten fast vollständig abgetrennt werden. Im auffallenden Lichte konnte nur noch eine schwache Opaleszenz beobachtet werden. Diese Lösung wurde während eines ganzen Monats bei 20° aufbewahrt. Es kam dabei zu keiner Trübungszunahme mehr. Nachdem also der unlöslich gewordene Anteil des Gliadins innert 14 Tagen ausgefallen war, enthielt die Lösung nur noch solches Protein, das bei 20° keine Veränderungen erleidet.

Diese Lösung wurde nun einen Monat lang bei 0° im Eisschrank aufbewahrt. Bei der Abkühlung trat sehr rasch eine Trübung ein. Bereits nach 24 std. hatte sich ein grosser Teil des Gliadins als honigartiger Tropfen am Boden des Glases abgeschieden. Nach weiteren 24 std. haftete an der Glaswand ein weisses Pulver. Dieser Niederschlag und das Gliadin liessen sich jedoch auch nach acht Tagen durch Temperaturerhöhung auf 20° immer noch in Lösung bringen.

Anders verhielt sich dieser Niederschlag nach einem Monat. Der Gliadintropfen ging durch kräftiges Schütteln bei 20° wieder in Lösung. Das weisse Pulver blieb jedoch auch bei 70° unlöslich. Durch Abzentrifugieren und

Wägen konnte festgestellt werden, dass bei 0° 7% des gelösten Gliadins in die unlösliche Modifikation übergegangen waren.

Die verbleibende Lösung blieb weitere acht Tage im Eisschrank. In dieser Zeit trat keine weitere Abscheidung eines weissen, unlöslichen Pulvers ein. Diese Lösung enthielt also auch bei 0° einen grossen Anteil des Proteins, der in 70%igem Alkohol nicht in die unlösliche Modifikation übergeht.

Bei längerer Abkühlung auf -10° würde sich der gleiche Vorgang vermutlich wiederholen.

Diese Versuche zeigen, dass nicht allein der 70%ige Alkohol für die Denaturierung des Gliadins verantwortlich ist. Bei jeder Temperatur sind in alkoholischen Gliadinlösungen zwei Anteile vorhanden. Der grössere Anteil unterliegt keinen Veränderungen. Der kleinere Anteil wird in Berührung mit dem wässerigen Alkohol in eine unlösliche Modifikation übergeführt. Bei 30° und höheren Temperaturen tritt dieser labile Anteil nicht in Erscheinung. Je mehr die Temperatur herabgesetzt wird, um so grösser wird die Menge des denaturierten Gliadins.

6. Messungen der Strömungsdoppelbrechung.

Auf die Grundlage der Methode und die experimentelle Anordnung soll an dieser Stelle nicht eingegangen wer-

den. Es kann hier nur auf die Spezialliteratur verwiesen werden: Ambronn-Frey (1926), Signer (1930 & 1933), Sadron (1936-38), Diss. Wissler (1940), Diss. Guggisberg (1940) und Diss. Meyer (1943).

A. Die Darstellung der Lösungen.

Für die Messungen der Strömungsdoppelbrechung wurde das Gliadin stets in 12%iger wässeriger Na-salicylatlösung gelöst. Von dem in trockener Form aufbewahrten Gliadin liessen sich jederzeit ganz bestimmte Mengen einwägen. Der Lösungsvorgang des Gliadins wurde dadurch beschleunigt, dass die Fläschchen bei 20° auf einer Maschine gerollt wurden.

Bei den folgenden Messungen hat sich gezeigt, dass eine Proteinkonzentration von 1% am vorteilhaftesten ist. Wird die Konzentration verringert, so sind die Lösungen nur schwach doppelbrechend. Der Strömungseffekt fällt so gering aus, dass die Fehlergrenze der Ablesungen am Analysator kaum überschritten wird. Enthalten die zu untersuchenden Lösungen dagegen 2% und mehr Protein, so werden die Gliadinlösungen so trübe, dass das monochromatische Licht zu stark abgeschwächt wird. Die Einstellung des Analysators kann nicht mehr zuverlässig erfolgen.

B. Ergebnisse der Messungen.

Vorerst wurde geprüft, ob das Gliadin in einer

12%igen Na-salicylatlösung ähnliche Veränderungen erleidet wie in 70%igem Alkohol. Eine 1%ige Gliadinlösung wurde $6\frac{1}{2}$ Wochen aufbewahrt. Die nach fast zwei Monaten mit derselben Lösung durchgeführten Messungen stimmten sehr gut überein mit den ursprünglich erhaltenen Werten. Mit Hilfe des Nephelometers konnte bestätigt werden, dass die Trübung dieser Lösung weder zu- noch abgenommen hatte.

Auf diese Weise wurde der Beweis erbracht, dass das Gliadin während $6\frac{1}{2}$ Wochen in einer 12%igen Na-salicylatlösung haltbar ist, ohne dass irgendwelche Veränderungen eintreten.

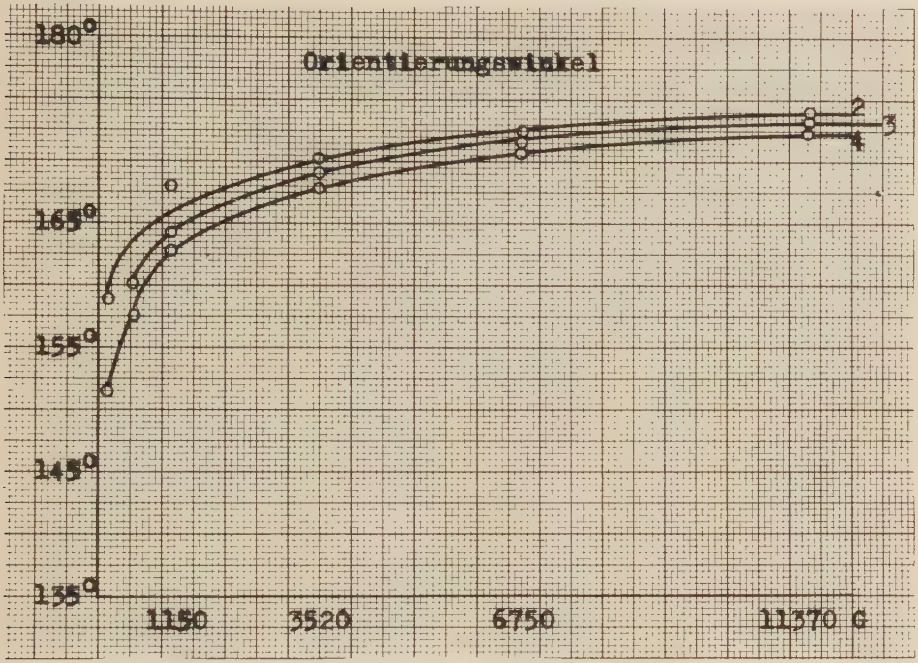
Es konnte ebenso nachgewiesen werden, dass ein bestimmtes Gliadinpräparat, welches 10 Monate in trockener Form aufbewahrt wurde, immer noch die gleiche Doppelbrechung aufwies.

Sehr interessante Resultate wurden erhalten bei der Untersuchung verschiedener Gliadinpräparate. In dem folgenden Diagramm sind die Orientierungswinkel von drei nach derselben Methode dargestellten Gliadinpräparaten in Abhängigkeit des Gradienten wiedergegeben. Es handelt sich um die Präparate 2, 3 und 4.

Die Präparate 2 und 3 wurden aus dem käuflichen Kleber isoliert. Bei ihrer Darstellung wurde allerdings das Gliadin 3 nur einmal in Eiswasser ausgefällt, das Gliadin 2 dagegen zweimal.

Das Gliadinpräparat 4 wurde aus dem Kleber des weis-

sen Semmelmehles isoliert. Es wurde ebenfalls nur einmal umgefällt, und dann in abs. Alkohol entwässert und im Vacuum getrocknet.

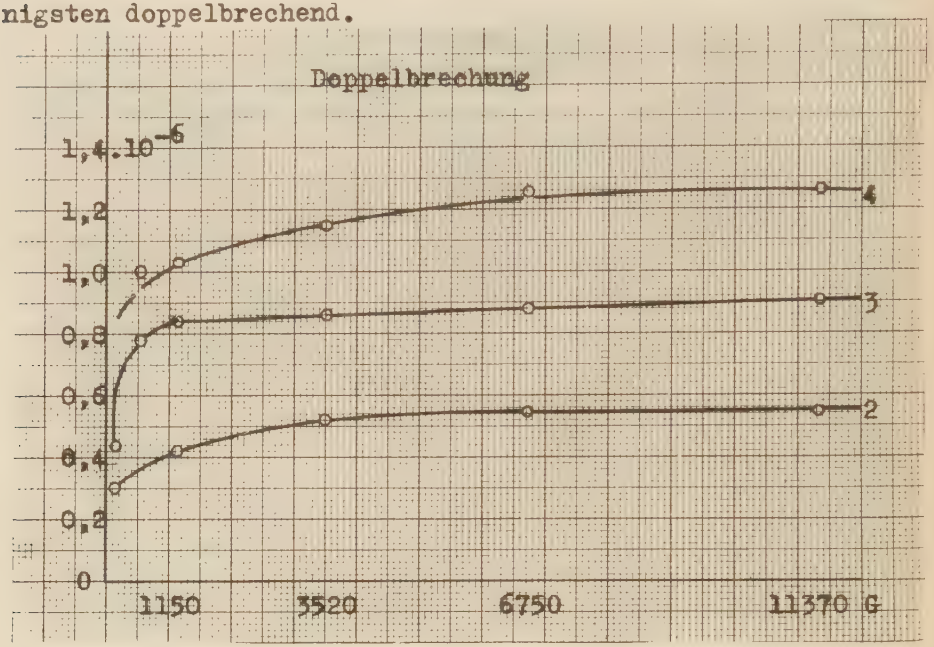


Für diese drei Präparate ist charakteristisch, dass sie annähernd dieselben Orientierungswinkel aufweisen. Die Orientierungswinkel geben Aufschluss über die Länge der untersuchten Teilchen.

Die Kurven steigen vom Gradienten 3500 fast nicht mehr an. Dies bedeutet, dass die Teilchen schon bei relativ kleiner Winkelgeschwindigkeit des Rotors ausgerichtet sind. Diese Erscheinung trifft nur zu für langgestreckte und grosse Teilchen.

In dem folgenden Diagramm ist die Stärke der Doppelbrechung der Gliadinpräparate 2 bis 4 wiedergegeben.

Das aus dem Semmelmehl, d.h. dessen Kleber, isolierte Gliadin 4 ist am stärksten doppelbrechend. Das Gliadin 3 nimmt eine Mittelstellung ein, und das Gliadin 2 ist am wenigsten doppelbrechend.



Die Kurven für die Doppelbrechung verlaufen ganz ähnlich denjenigen der Orientierungswinkel. Nirgends besteht Proportionalität zwischen der Doppelbrechung und den Gradienten.

Die Kurvenbilder der Orientierungswinkel und der Doppelbrechung sagen folgendes aus:

diejenigen Teilchen, welche die Strömungsdoppelbrechung bewirken, können sicher nicht kugelige Gestalt haben; kugelige Teilchen erfahren beim Strömen keine Ausrichtung.

die übereinstimmenden Orientierungswinkel deuten an, dass die die Doppelbrechung verursachenden Teilchen

in den Gliadinpräparaten 2 bis 4 praktisch dieselbe Grösse besitzen.
die Unterschiede in der Doppelbrechung sind so zu deuten, dass das Präparat 4 mehr doppelbrechende Teilchen enthält als das Präparat 2, obschon die Proteinkonzentration in den untersuchten Lösungen gleich ist.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Gliadinpräparate eine grössere Reinheit aufweisen, wenn sie mehrmals umgefällt werden. Die Isolierung der Präparate 6 bis 11 erfolgte nach der auf Seite 58 beschriebenen Methode.

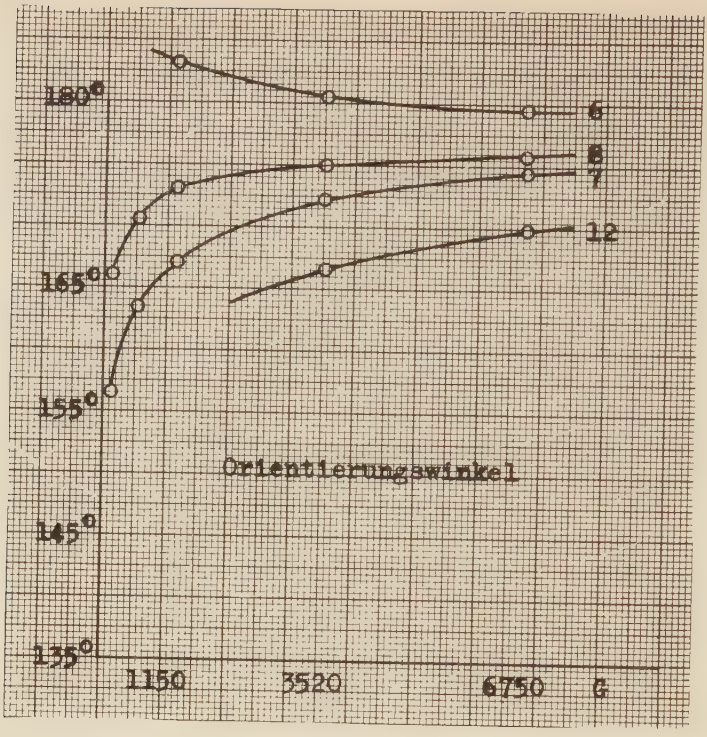
Von jedem der Präparate wurde eine 1%ige Lösung in 12%igem Na-salicylat hergestellt.

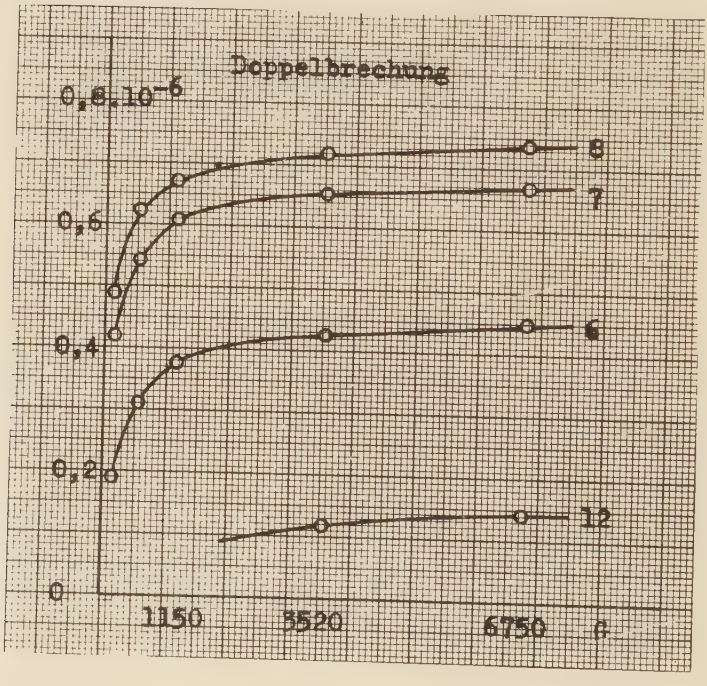
Vorerst war auffallend, dass die Lösungen der Gliadine 6 bis 8 eine zunehmende Trübung aufwiesen. Die Präparate 9 bis 11 lösten sich dagegen wasserklar auf.

Bei den Messungen der Strömungsdoppelbrechung traten ebenfalls sehr deutliche Unterschiede auf. Nur die drei ersten Präparate waren doppelbrechend. Bei den Gliadinen 9 bis 11 konnte kein Strömungseffekt gemessen werden.

In den beiden folgenden Diagrammen sind Orientierungswinkel und Doppelbrechung der Gliadinpräparate 6 bis 8 wiedergegeben. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

das Präparat 6 ist jedenfalls polydispers. Dass die Orientierungswinkel mit steigendem Gradienten abnehmen, kann nur so gedeutet werden.


180°
165°
155°
145°
135°
Orientierungswinkel
1150
3520
6750
G
6
8
7
12


Doppelbrechung
0,8.10⁻⁶
0,6
0,4
0,2
0
1150
3520
6750
G
8
7
6
12

die Präparate 7 und 8 weisen ganz ähnliche Orientierungswinkel auf. Diese beiden Kurven stehen ferner in guter Uebereinstimmung mit den auf Seite 67 abgebildeten. Die Gliadine 7 und 8 weisen also wieder die gleichen Teilchen auf.
in der Stärke der Doppelbrechung kommt deutlich zum Ausdruck, dass diese mit der Trübung der Lösungen zunimmt. Die Lösung des Präparates 8, welche am stärksten getrübt war, enthielt also am meisten doppelbrechende Teilchen.

Schliesslich wurden die Präparate 6 bis 8 vermischt und zusammen in 70%igem Alkohol gelöst. Diese Gliadinlösung war 4%ig. Sie wurde während 14 Tagen bei 20° aufbewahrt. In dieser Zeit hatte sich jenes als denaturiertes Gliadin bezeichnete Produkt abgeschieden. Die abzentrifugierte Menge betrug 29% des gelösten Gliadins. Aus der verbleibenden Lösung wurde ein kleiner Anteil Gliadin ausgefällt, entwässert und getrocknet. Dies ergab das Gliadinpräparat 12.

Von diesem Gliadin 12 sind Orientierungswinkel und Doppelbrechung ebenfalls in den vorliegenden Diagrammen eingetragen. Dieses Präparat, das aus einer nur schwach opaleszierenden Lösung hervorging, ist also weniger stark doppelbrechend.

Diese Untersuchungen zeigen, dass das Gliadin durch die mehrmalige Umfällung nicht eine Reinigung, sondern eine Veränderung anderer Art erfährt. Das Präparat 8, welches

zweimal umgefällt wurde, stand länger mit dem 70%igen Alkohol in Berührung als das Präparat 6. Bei den Gliadinen 6 bis 8 zeigt sich, dass jenes Präparat 8, welches am längsten mit dem wässerigen Alkohol in Berührung gekommen war, am meisten doppelbrechende Teilchen aufweist.

Diese Erscheinung verläuft also analog wie die bereits beobachtete Trübungszunahme und Ausflockung der 1%igen Gliadinlösung in 70%igem Alkohol bei 20°. Bei dem Präparat 8 hatte die Trübung offenbar ihr Maximum erreicht. Während dieses Präparat wieder in 70%igem Alkohol in Lösung gebracht wurde, musste offenbar auch die Ausflockung des denaturierten Anteiles erfolgt sein. Nach der Filtration war die alkoholische Lösung jedenfalls ganz klar.

Es zeigt sich demnach, dass der labile Anteil im Gliadin durch mehrmaliges Umfällen vollständig abgetrennt werden kann. Ist dies schliesslich eingetreten, so erfolgt keine weitere Denaturierung. Daher war nicht nur die Lösung von Gliadin 9 wasserklar, sondern auch diejenigen von Gliadin 10 und 11.

Schliesslich wurde auch ein nach der Methode von Dill & Alsberg hergestelltes Gliadinpräparat auf seine Doppelbrechung beim Strömen geprüft. Dieses Gliadin wurde also aus einer wasserklaren alkoholischen Lösung ausgefällt. Das getrocknete Präparat löste sich auch in 12%iger Na-salicylatlösung ganz klar auf. Ein Strömungseffekt konnte auch hier nicht gemessen werden. Ganz klare Gliadinlösungen in Na-salicylat sind also nicht doppelbrechend.

Bei Messungen der Strömungsdoppelbrechung wird auch die Viscosität der untersuchten Lösungen ermittelt. Die relative Viscosität ist sehr aufschlussreich bei der Deutung der Doppelbrechungserscheinungen.

Die relative Viscosität der Gliadinpräparate 6 bis 8 nahm annähernd linear zu. Sie betrug:

Gliadin 6	1,197
Gliadin 7	1,204
Gliadin 8	1,210

Jene Gliadinpräparate, die ganz klare Lösungen ergaben, wiesen eine bedeutend niedrigere relative Viscosität auf. In diesen Lösungen waren die denaturierten Anteile nicht mehr vorhanden. Es wurden hier Werte von 1,06 bis 1,08 ermittelt. Alle viscosimetrisch ausgemessenen Lösungen enthielten 1% Gliadin.

Nach Einstein muss eine 100%ige Lösung, welche ausschliesslich kugelige Teilchen enthält, eine relative Viscosität von $1 + 2{,}5\cdot$ aufweisen. Eine 1%ige Lösung dieser Teilchen würde den Wert $1 + 0{,}025$ ergeben. Dies entspricht einer spezifischen Viscosität von 0,025.

Die Gliadinpräparate 6 bis 8 weisen spezifische Viscositäten von 0,197 bis 0,210 auf. Diese Daten sind rund achtmal grösser als jene für kugelige Teilchen.

Die spezifische Viscosität der reinsten Gliadinlösungen beträgt 0,06 bis 0,08. Diese Werte sind dagegen nur zwei- bis dreimal grösser als die für kugelige Teilchen errechneten.

Die verhältnismässig kleine relative Viscosität, in Beziehung gebracht mit den Messresultaten der Strömungsdoppelbrechung, deuten an, dass in jenen Gliadinlösungen, die doppelbrechend sind, die Konzentration der grossen Teilchen sehr gering sein muss. Enthielten diese Lösungen viele doppelbrechende, also grosse Teilchen, so müsste die relative Viscosität bedeutend grössere Werte annehmen.

Diese Erscheinungen gestatten es, die denaturierende Wirkung des wässerigen Alkohols folgendermassen zu deuten:

Reines Gliadin ist gar nicht doppelbrechend, weil es in Na-salicylatlösung annähernd kugelige Teilchen aufweist.

Die bisher beobachtete Strömungsdoppelbrechung ist ausschliesslich dem denaturierten Gliadin zuzuschreiben. Seine spezifische Viscosität ist achtmal grösser als die jenige für kugelige Teilchen.

Der Vorgang der Denaturierung könnte als Kettenaggregation aufgefasst werden. Die Formen der Kurven für die Orientierungswinkel sind beweisend für die Tatsache, dass es sich nur um grosse und langgestreckte Teilchen handelt.

Krejci & The Svedberg haben mit Hilfe der Ultrazentrifuge nachweisen können, dass reines Gliadin (ebenfalls dargestellt nach der Methode von Dill & Alsberg) polydispers ist. Bei höheren Temperaturen herrschen Teilchen mit dem Molekulargewicht 17250 vor. Die durch zunehmende

Abkühlung erhaltenen Gliadinfraktionen wiesen dagegèn zunehmende Mengen von schwereren Molekülen auf. Ihrer Ansicht nach sind die Gliadinmoleküle lang und dünn.

7. Kleberextraktionen mit Na-salicylatlösung.

Wie bereits beschrieben wurde, haben Mc Calla & Nils Gralén (1940) feststellen können, dass mit einer 12%-igen Na-salicylatlösung 84% des im Kleber enthaltenen Proteins herausgelöst werden können. Dieses Lösungsmittel nimmt also mindestens sechsmal so viel Kleberprotein auf als der 70%ige Alkohol.

Dass das Gliadin in Na-salicylatlösungen löslich ist, zeigten die bisher beschriebenen Versuche. Auch das als Glutenin bezeichnete Protein löste sich, nach den Angaben von Cook & Alsberg, in neutralen Lösungsmitteln. Also müssen beide Proteine in einem 12%igen Na-salicylatextrakt enthalten sein.

Es ergab sich die Frage, ob diese Kleberlösungen ebenfalls doppelbrechend sind. Wie bereits gezeigt wurde, weist reinstes Gliadin bei der Strömungsdoppelbrechung keinen Effekt auf. Ob jener Anteil, welcher bisher als denaturiertes Gliadin bezeichnet wurde, wirklich nur irreversibel verändertes Gliadin darstellt, oder ob es sich um ein anderes Protein handelt, kann bis jetzt noch nicht festgelegt werden. Es wäre denkbar, dass jene labile Kom-

ponente vom Glutenin herrührt. Vielleicht wird bei der alkoholischen Extraktion des Klebers auch ein kleiner Anteil des Glutenins herausgelöst. Mit der Zeit scheidet sich aber dieses Glutenin wieder als unlösliches Produkt ab. In diesem Falle wäre dann die Bezeichnung "denaturiertes Gliadin" falsch. Dieser labile Anteil müsste vielmehr als mitgelöstes Glutenin bezeichnet werden. Dann müsste also dem Glutenin die starke Doppelbrechung zukommen.

Wenn demnach die Na-salicylatextrakte des Klebers die gleiche oder noch stärkere Doppelbrechung aufweisen würden wie das denaturierte Gliadin, so müsste dies einzig und allein dem Glutenin zugeschrieben werden.

Demgegenüber ist der andere Fall denkbar, dass solche Extrakte gar nicht doppelbrechend sind, wie das reine Gliadin. Dann dürfte mit Bestimmtheit gesagt werden, dass jene labile Komponente im Gliadin wirklich ein irreversibel veränderter Anteil dieses Proteins sei.

Die gemachten Versuche werden zeigen, dass keine der beiden Erwartungen eingetroffen ist. Die Na-salicylatlösungen des Klebers wiesen einen ganz andern Effekt der Strömungsdoppelbrechung auf.

A. Die Extraktionsmethode.

Bei der Extraktion des Klebers mit 12%iger Na-salicylatlösung wurde ganz ähnlich vorgegangen wie bei den al-

koholischen Extraktionen. Zuerst wurde aus dem Semmelmehl der Kleber isoliert. Der Feuchtkleberklumpen wurde in allerkleinste Teilchen zerzupft. Diese wurden dann in die 12%ige Na-salicylatlösung geworfen.

Auf 100 Teile frischen Feuchtklebers wurden 1000 Teile Salicylatlösung verwendet. In einer verschlossenen Flasche wurde diese Lösung 6-8 std. auf der Maschine geschüttelt. Je feiner der Kleber anfänglich zerkleinert wurde, um so mehr ging davon in Lösung. Eine restlose Auflösung des Klebers wurde allerdings unter diesen Bedingungen nicht erreicht.

Eine vollständige Dispersion des Feuchtklebers konnte erreicht werden, wenn eine grössere Lösungsmittelmenge aufgewendet wurde. 1 gr Kleber löste sich praktisch vollständig in 100ccm Salicylatlösung, d.h. der verbleibende Bodenkörper war nur noch ganz unbedeutend.

Dass der Feuchtkleber 67% Wasser enthält, wurde bei diesen Extraktionen nicht berücksichtigt. 67 gr Wasser verdünnen 1 lt einer 12%igen Na-salicylatlösung nur auf 11,25%. Diese Konzentrationsverminderung des Salzgehaltes in dem Lösungsmittel hat praktisch keine Bedeutung. Nach Mc Calla & Nils Gralén löst eine 11,25%ige Na-salicylatlösung immer noch über 80% des Klebers molekular auf.

Es wurde auch versucht, den nach der alkoholischen Extraktion des Klebers verbleibenden Rückstand noch mit Salicylatlösung zu extrahieren. Die herausgelöste Protein-

menge war ganz ausserordentlich gering. Mit $MgSO_4$-Lösung konnte aus dem Extrakt gar kein Protein ausgefällt werden.

Dieser Versuch zeigt, dass der 70%ige Alkohol doch denaturierende Wirkungen ausübt. Er führt den Kleber in eine Modifikation über, die in Na-salicylatlösung nicht mehr löslich ist.

Spencer & Mc Calla haben bereits nachgewiesen, dass eine einzige Extraktion des Klebers genügt, um mit 8- und mehr-%iger Na-salicylatlösung den Kleber fast vollständig zu dispergieren. Im zweiten und dritten Extrakt von der gleichen Kleberportion waren nur noch ganz unbedeutende Mengen Protein-N enthalten. Es erübrigte sich daher, den Kleber mehr als einmal mit Na-salicylatlösung zu extrahieren.

In derselben Arbeit führen Spencer & Mc Calla aus, dass Na-salicylatlösungen ebenfalls denaturierend auf den Kleber wirken können. Die Verfasser konnten nachweisen, dass der Kleber ganz beträchtlich von seiner Löslichkeit einbüsste, wenn er mehrmals nacheinander mit diesem Lösungsmittel extrahiert wurde.

Sie extrahierten den Kleber zuerst mit einer 2%igen Na-salicylatlösung. Hierbei gingen nur 38,5% des Kleber-N in Lösung. Der Rückstand löste sich nachher nicht mehr vollständig in 10%iger Salicylatlösung, was normalerweise sonst möglich ist.

8. Die Klärung der Na-salicylat-Kleberextrakte.

Die Klärung der Na-salicylatextrakte gestaltete sich noch viel schwieriger als diejenige der alkoholischen Kleberextrakte.

Die Kleberlösungen in Na-salicylat sind ganz undurchsichtig, schleimig und dickflüssig. Eine Lösung wurde mehr als einen Monat stehen gelassen. Dabei trat nicht die geringste Klärung ein.

Auch durch Zentrifugieren bei 3000 U.p.m. während mehrerer Stunden konnten keine durchsichtigen Lösungen erhalten werden.

Die früher beschriebene Filtrationsmethode von Osborne versagte ebenfalls. Die filtrierende Schicht aus Papierschlamm wurde fast augenblicklich verstopft.

Bei Versuchen, das dispergierte Protein auszufällen, wurde folgende Eigentümlichkeit entdeckt: wird einem Na-salicylat-Kleberextrakt eine bestimmte Menge $MgSO_4$ in wässeriger Lösung zugefügt, setzen sich die suspendierten Teilchen vollständig ab. Die überstehende Flüssigkeit wird hierbei wasserklar.

Ausgedehnte Versuche führten schliesslich zu einer sehr befriedigenden Klärungsmethode:

Auf je 100ccm Extrakt müssen 30ccm einer 10%igen $MgSO_4$-Lösung zugegeben werden. Nach der Durchmischung bleibt die Lösung 24 std. stehen. Nachher wird die Lösung vor-

sichtig vom Bodenkörper abgehebert. Schliesslich wird sie während 20-30 min. bei 2500 U.p.m. zentrifugiert. Auf diese Weise wird der Extrakt wasserklar.

Wird zu wenig $MgSO_4$ zugegeben, so setzen sich die suspendierten Teilchen nicht vollständig ab. Fügt man dagegen zu viel Salzlösung hinzu, so werden nicht nur die suspendierten Kleberteilchen niedergeschlagen, sondern auch das gelöste Protein fällt teilweise aus. Dabei bleibt die Lösung dennoch trübe. Nur eine ganz bestimmte $MgSO_4$-Menge ist im Stande, diese Kleberextrakte zu klären.

Es wurde geprüft, ob die klärende Wirkung der $MgSO_4$-Lösung mit der H^+-Konzentration in Beziehung gebracht werden könnte. Das p_H der Lösungen wurde mit Lyphanpapierstreifen gemessen. Es zeigten sich jedoch gar keine Zusammenhänge. Die eintretende Klärung ist also nur abhängig von der zugefügten Salzmenge.

9. Die Ausfällung des gelösten Klebers.

Als Fällungsmittel wurden verwendet:

H_2O K_2SO_4 $MgSO_4$ $Al_2(SO_4)_3$.

Bei starker Verdünnung eines Na-salicylat-Kleberextraktes mit Wasser, bildete sich sofort eine milchige Trübung. Zu einer merklichen Ausfällung kam es erst nach drei Tagen. Eine quantitative Ausfällung trat nicht ein.

Etwas rascher vollzog sich die Bildung eines Niederschlages, wenn einem Kleberextrakt K_2SO_4-Lösung zugefügt wurde.

Mit $MgSO_4$-Lösung erfolgte die Ausfällung noch schneller und bedeutend reichlicher. Nach 24-48 std. setzte sich der Niederschlag fast vollständig ab.

Eine sofortige Ausfällung des Proteins wurde durch Zugabe von $Al_2(SO_4)_3$-Lösung erreicht. Augenblicklich bildete sich ein voluminöser, steifer Niederschlag. Das p_H der Lösung betrug 4,0. Bei dieser Acidität fällt aber nicht nur das Protein aus, sondern die Salicylsäure scheidet sich ebenfalls ab. Aus diesem Grunde ist die Verwendung von $Al_2(SO_4)_3$ nicht empfehlenswert, wenn der gelöste Kleber ausgefällt werden soll.

Diese Versuche zeigen, dass die Wirksamkeit der Salzlösungen mit der Wertigkeit des Kations zunimmt.

Die Ausfällung des gelösten Klebers aus den Nasalicylatextrakten wurde schliesslich mit einer bei 20° gesättigten $MgSO_4$-Lösung bewirkt. Zuerst wurden die Extrakte nach der bereits beschriebenen Methode geklärt. Dann wurde zu dem Extrakt so viel Fällungsmittel gegeben, bis die milchige Trübung nicht mehr zunahm. Die gut durchmischte Lösung blieb während 24-48 std. bei Raumtemperatur stehen. Dann wurde die überstehende klare Flüssigkeit abgehebert. Durch Zentrifugieren der jetzt verbleibenden

Flüssigkeit konnte schliesslich das Ausgefällte zu einer klebrigen Masse vereinigt werden. Dieses Produkt wurde anschliessend mehrmals mit frischem Wasser ausgeknetet. So liessen sich die anhaftenden Salzreste schnell abtrennen.

Das nach dieser Methode ausgefällte und gereinigte Produkt liess sich wasserklar in 12%iger Na-salicylatlösung auflösen.

Für Messungen der Strömungsdoppelbrechung ist es ausserordentlich wichtig, dass die zu untersuchenden Lösungen ganz klar sind. Schon leicht getrübte Flüssigkeiten erschweren die Einstellung des Analysators am Polarisationsmikroskop derart, dass die Messungen sehr bald unzuverlässig ausfallen.

10. Messungen der Strömungsdoppelbrechung.

Nachdem es schliesslich gelungen war, die Na-salicylatextrakte des Klebers vollständig zu klären, konnten die Messungen der Strömungsdoppelbrechung durchgeführt werden.

Diese Lösungen sind nicht so stark doppelbrechend wie die untersuchten Gliadinlösungen. Daher muss die Proteinkonzentration mindestens 2% betragen.

Die Herstellung dieser Kleberlösungen gelingt nicht so leicht, wie dies bei den Gliadinlösungen der Fall ist.

Das Gliadin liegt immer in trockener Pulverform vor. Es kann also leicht eingewogen werden. Der ausgefällte Kleber muss aber sofort nach der Reinigung wieder in möglichst wenig 12%iger Na-salicylatlösung gelöst werden. Eine Trocknung darf nicht eingeschaltet werden, weil dieses Produkt sonst seine Löslichkeit weitgehend verliert. Daher bleibt nichts anderes übrig, als dass der N-gehalt jeder Lösung nach Kjeldahl bestimmt wird. Daraus lässt sich die Proteinkonzentration leicht errechnen.

In den folgenden Diagrammen sind A, B und C verschiedene Präparate.

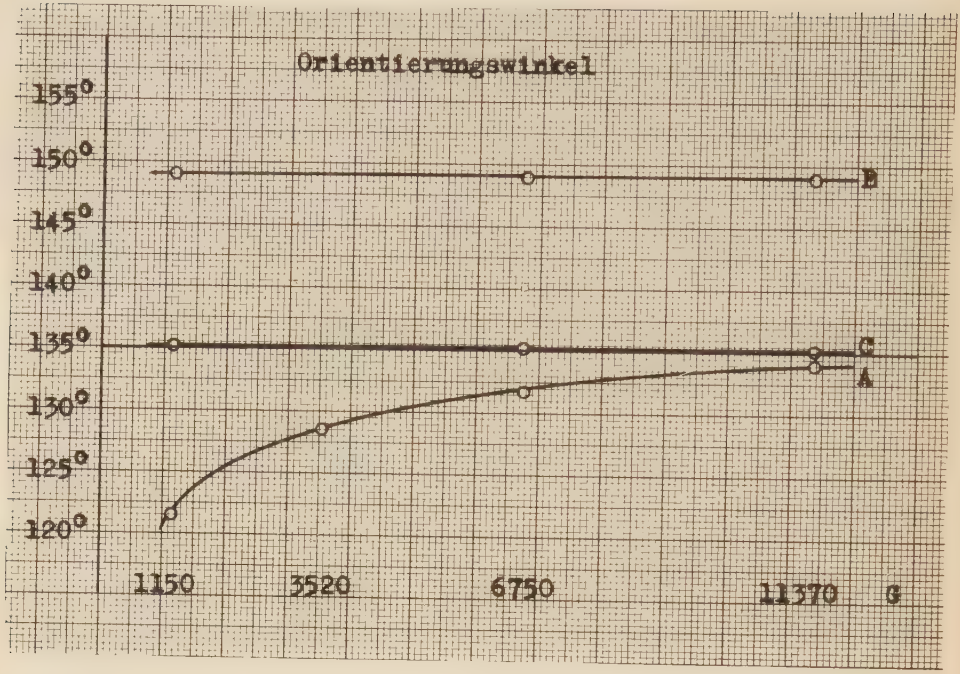
Das Präparat A stellt jenes Produkt dar, welches aus dem geklärten Salicylatextrakt des Klebers mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung ausgefällt wurde. Die untersuchte Lösung war annähernd 2%ig.

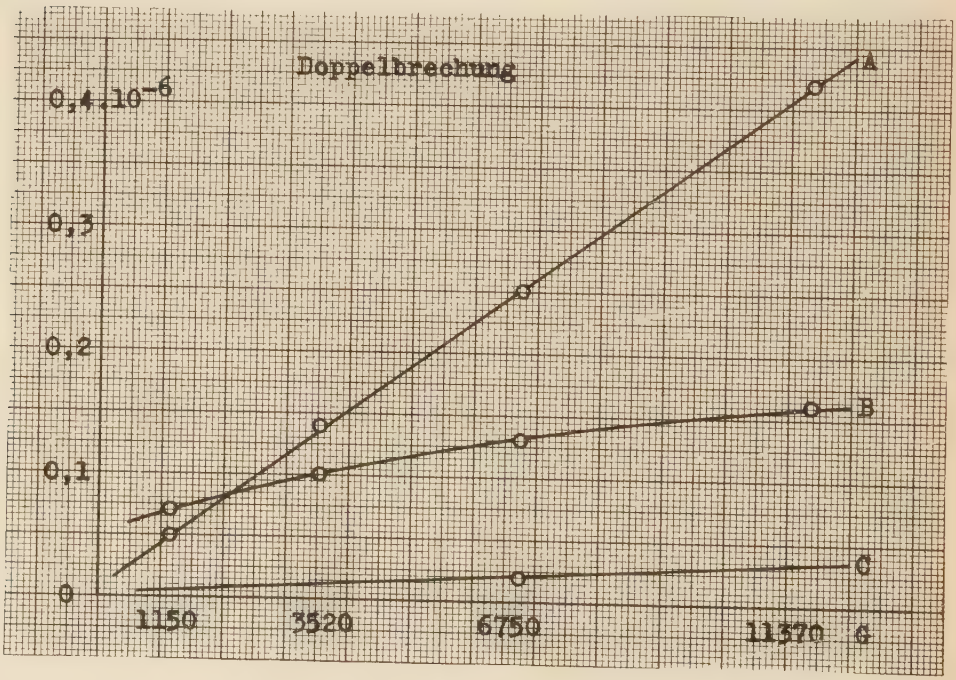
Ein Teil des Kleberpräparates A wurde mit 70%igem Alkohol extrahiert. Als die alkoholische Lösung in Eiswasser gegossen wurde, trat dieselbe Erscheinung ein wie bei der Gliadinausfällung. Dieses Produkt wurde genau gleich aufgearbeitet wie das Gliadin. Von dem getrockneten Pulver wurde eine 1%ige Lösung in Salicylat hergestellt. Dies stellt das Präparat C dar.

Der nach der alkoholischen Extraktion verbleibende Rückstand wurde wieder in 12%iger Na-salicylatlösung gelöst. So wurde das Präparat B erhalten.

Die folgenden Kurven geben Aufschluss über Orientierungswinkel und Stärke der Doppelbrechung der verschie-

denen Kleberpräparate A bis C:





Die Kurve der Orientierungswinkel für das Präparat A hat eine ähnliche Form wie jene des denaturierten Gliadins. Aussergewöhnlich ist jedoch, dass die Werte zwischen 120 und 135° liegen. Positiv doppelbrechende Lösungen weisen normalerweise Orientierungswinkel zwischen 45 und 90° auf, negativ doppelbrechende solche zwischen 135 und 180°. Die vorliegende Kurve kann nur so erklärt werden, dass sich zwei oder mehrere Komponenten in dieser Lösung befinden, deren Strömungseffekte durch Superposition einen bestimmten Gesamteffekt ergeben.

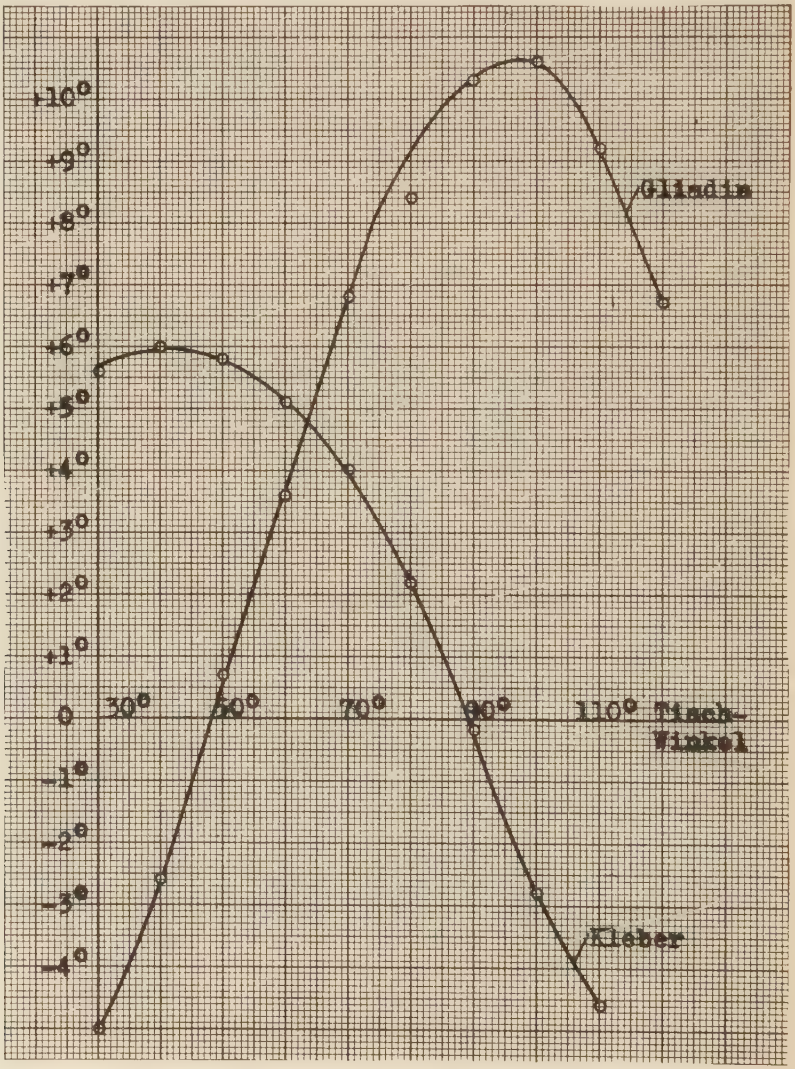
Sadron & Mosimann (1938) haben einige Spezialfälle dieser Art berechnet. Die durchgeführten Versuche bestätigten die Ergebnisse ihrer Berechnungen sehr gut. Ein von ihnen berechneter Spezialfall ist gerade identisch mit der hier vorliegenden Kurve. Sie fanden, dass die Kurve der Orientierungswinkel so liegen muss, wie dies für das Präparat A zutrifft, wenn die untersuchte Lösung eine Mischung von positiv und negativ doppelbrechenden Teilchen enthält.

Sehr bemerkenswert ist die Kurve für die Stärke der Doppelbrechung des Präparates A. Es besteht deutlich Proportionalität zwischen der Doppelbrechung und den Gradienten, was charakteristisch ist für kurze Teilchen.

Diese Tatsachen zeigen vorläufig, dass die Na-salicylatlösung etwas anderes aus dem Kleber herauslöst als der 70%ige Alkohol.

Das Präparat A wurde durch die alkoholische Behandlung in zwei Komponenten aufgespalten, die ganz verschiedene Auslöschwinkel aufweisen. Die Präparate B und C ergaben Orientierungswinkel, die trotz zunehmendem Gradienten konstant blieben. Der kleine Orientierungswinkel des Präparates C sagt aus, dass es sich um kleine Teilchen handeln muss, die sozusagen keine Richtung erfahren. Jedenfalls ist das Präparat C nicht identisch mit Gliadin.

Einen guten Ueberblick gestatten die folgenden Kurven:



Die Formen und die Lagen dieser beiden Kurven sagen aus:

Die 1%ige Gliadinlösung ist bedeutend stärker doppelbrechend als die 2%ige Kleberlösung.

Die Gliadinkurve hat ihr Maximum bei einem Tischwinkel von 90°. Der aufsteigende Ast der Kurve schneidet die Abszisse bei einem Tischwinkel von 48°. Dieser Kurventypus entspricht Lösungen, die lange und negativ doppelbrechende Teilchen enthalten.

Die Kleberkurve hat ihr Maximum bei 45° und schneidet die Abszisse bei 90°. Diese Tatsachen sprechen ebenfalls für eine negativ doppelbrechende Lösung, die aber kurze Teilchen enthält.

Die Gliadinlösungen sowie die Kleberlösungen sind also beim Strömen negativ doppelbrechend. Ihr Hauptunterschied besteht darin, dass die Kleberteilchen kurz gestaltet sind. Dass sie aber doppelbrechend sind, ist ein Beweis dafür, dass sie grösser sein müssen als die Teilchen des reinsten Gliadins, jedoch bedeutend kleiner als jene des denaturierten Gliadins.

In ihrer Gesamtheit sind die Kleberteilchen negativ doppelbrechend. Die Lage der Orientierungswinkel sagt jedoch aus, dass in dieser Lösung eine Mischung von negativ und positiv doppelbrechenden Teilchen vorliegen muss. Die Erklärung hierfür muss also lauten: die positiv doppelbrechenden Teilchen stehen mengenmässig stark hinter den negativ doppelbrechenden zurück, sodass der Effekt

der negativ doppelbrechenden Teilchen überwiegend zum Ausdruck kommt.

Abschliessend kann also festgestellt werden, dass bisher drei Produkte aus dem Kleber isoliert wurden. Diese unterschieden sich grundsätzlich bei der Strömungsdoppelbrechung.

Vorerst das reine Gliadin, welches gar nicht doppelbrechend ist.

Dann jener kleine Anteil, der als denaturiertes Gliadin angesprochen wurde.

Schliesslich das mit Na-salicylatlösung aus dem Feuchtkleber extrahierte Produkt.

IV. Zusammenfassung.

Das mit 70%igem Alkohol aus dem Weizenkleber extrahierte Gliadin ist nicht ein homogenes Protein. Neben einer beständigen ist auch eine veränderliche Komponente anzutreffen.

Der labile Anteil im Gliadin wird durch wässerigen Alkohol irreversibel denaturiert. Von grossem Einflusse ist hierbei die Temperatur. Oberhalb 30° unterliegt auch die labile Komponente keinen Veränderungen. Je tiefer die Temperatur sinkt, um so mehr denaturiertes Gliadin scheidet sich unlöslich aus.

Nach der Methode von Dill & Alsberg ist es gelungen, die veränderliche Komponente im Gliadin vollständig zu entfernen.

Die bei der Strömungsdoppelbrechung gemessenen Effekte sind ausschliesslich dem denaturierten Gliadin zuzuschreiben. Je mehr eine Gliadinlösung getrübt ist, d.h. je mehr verändertes Protein sie enthält, um so stärker wirkt sie doppelbrechend.

Bei der Denaturierung lagern sich die Gliadinteilchen nicht beliebig zusammen. Die Kettenaggregation ist vorherrschend. Die Gliadinteilchen vereinigen sich zu

längeren Gebilden. Dies geht aus der Tatsache hervor, dass diese Gebilde schon bei relativ kleinen Gradienten fast vollständig gerichtet werden beim Strömen.

Wird vom Gliadin die labile Komponente restlos abgetrennt, so bleibt ein Protein zurück, welches beim Strömen nicht mehr doppelbrechend ist. Dies darf als Bestätigung der Ansicht von The Svedberg aufgefasst werden, dass Gliadin ein niedermolekulares Protein ist.

Es war geplant, die von Haugaard & Johnson beschriebenen Gliadinfraktionen ebenfalls zu isolieren. Da jedoch das reine Gliadin nicht doppelbrechend ist, kann nicht erwartet werden, dass seine Fraktionen diese Eigenschaft aufweisen sollen. Aus den beschriebenen Untersuchungen geht hervor, dass mit der Methode der Strömungsdoppelbrechung keine weiteren Einblicke in den Bau dieses Kleberproteins möglich sind.

Na-salicylatextrakte aus frischem Feuchtkleber können mit einer ganz bestimmten Menge $MgSO_4$ in wässeriger Lösung vollständig geklärt werden. Dieser Vorgang ist unabhängig vom p_H der Lösung.

Aus den geklärten Extrakten wird durch gesättigte $MgSO_4$-Lösung das gelöste Protein fast vollständig ausgefällt. Mit diesem Produkt können nachher viel konzentriertere Lösungen in Na-salicylat hergestellt werden, die wasserklar sind.

Diese konzentrierten Kleberlösungen weisen beim Strömen eine gut messbare Doppelbrechung auf.

Die durch Denaturierung entstehenden Gliadinaggregate und die in Na-salicylat gelösten Kleberteilchen sind übereinstimmend negativ doppelbrechend. Ihr Hauptunterschied besteht jedoch darin, dass erstere längliche Teilchen bilden, während der gelöste Kleber kurze Teilchen aufweist. Neben diesen kurzen negativ doppelbrechenden Teilchen sind in den Kleberlösungen noch solche vorhanden, die positiv doppelbrechend wirken.

Die letzten Versuche haben den Beweis erbracht, dass die Methode der Strömungsdoppelbrechung doch geeignet wäre, etwas tiefer in das Kleberproblem einzudringen. Nach den beschriebenen Fraktionierungsmethoden müsste der Kleber in mehrere Komponenten aufgeteilt werden. Vermutlich würden sich diese durch ihre Doppelbrechung unterscheiden. Wenn dies tatsächlich der Fall wäre, so müssten diese Erscheinungen als weitere Stützen der Theorie von Soerensen betrachtet werden.

Literatur-Verzeichnis.

Ritthausen	Eiweisskörper der Getreidearten	1872
Osborne & Harris	Z.analyt.Chem. 44, 516	1905
Osborne	Z.analyt.Chem. 46, 749	1907
Osborne(Abderhalden)	Handb. d. biol. Arbeitsmethoden	1908
Schleimer	Z.Unt.Nahrungs- & Genussm.27, 743	1914
Bailey & Blish	J.Biol.Chem. 23, 345	1915
Lüers	Kolloid Z. 25 (5), 177	1919
Dill & Alsberg	Cereal Chem. 1, 222	1924
Blish & Sandstedt	Cereal Chem. 2, 57	1925
Dill & Alsberg	J.Biol.Chem. 65, 279	1925
Blish	J.Assoc.Official Agr.Chem. 9, 417	1926
Ambronn-Frey	Das Polarisationsmikroskop	1926
Blish & Sandstedt	J.Biol.Chem. 85, 195	1929
Blish & Sandstedt	Cereal Chem. 7, 421	1930
Soerensen	Kolloid Z. 53, 102, 170, 306	1930
Haugaard & Johnson	Compt.rend.Carlsberg 18, No.2	1930
Cook & Alsberg	Can.J.Research 5, 355	1931
Troensegaard	Z.physiol.Chem. 199, 130	1931
Sandstedt & Blish	Cereal Chem. 10, 359	1933
Cook & Rose	Nature, London 134, 380	1934
Cook & Rose	Can.J.Research 12, 63, 438, 448	1935
Mc Calla & Rose	Can.J.Research 12, 346	1935
Krejci & Svedberg	J.Am.Chem.Soc. 57, 946, 1365	1935
Blish	Suppl.Cereal Chem. 13 (5), 16	1936
Harris & Bailey	Cereal Chem. 14, 182	1937
Stockelbach & Bailey	Cereal Chem. 15, 801	1938

Sadron	J.de Phys. IX, 381	1938
Sadron & Mosimann	J.de Phys. IX, 384	1938
Spencer & Mc Calla	Can.J.Research C16, 483	1938
Norval Burk	J.biol.Chemistry 134, 49	1938
Kniaginicev & Gerolkina	Chem.Z. I, 1896	1938
Duclaux & Dobry	C.R.Trav.Lab.Carlsberg 22, 155	1938
Mc Calla & Gralén	Nature, London 146, 60	1940
Diss. Wissler	Bern	1940
Diss. Guggisberg	Bern	1940
Diss. Meyer	Bern	1943

C u r r i c u l u m v i t a e .

Am 23.Februar 1915 wurde ich, F r a n z K n a p p von Tüscherz, in Naters bei Brig geboren. In Bern besuchte ich die Privatschule Aeschbacher, anschliessend das städtische Progymnasium und schliesslich die Realschule des städtischen Gymnasiums. Nach bestandener Maturität im Herbst 1935 immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Bern. Bis zum Herbst 1941 widmete ich mich dem Studium der Chemie. Seither arbeitete ich mit einigen durch den Aktivdienst bedingten Unterbrüchen an meiner Doktorarbeit.